

**Knochenreaktion und Pharmakokinetik von  
synthetischem, nanokristallinem Hydroxylapatit  
in Kombination mit Clindamycin  
nach Implantation in den Femurmarkraum  
von Kaninchen**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Karl Hermann Hubenschmid**

aus Konstanz

Giessen (2010)

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Reinhard Schnettler  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Dekan: Prof. Dr. T. Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. Dr. R. Schnettler

Gutachter: Prof. Dr. C. Melzer

Tag der Disputation: 15.11.2010

gewidmet

meiner verstorbenen Mutter

**Herta Hubenschmid**

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>ABKÜRZUNGEN, MAßEINHEITEN UND SYMBOLE .....</b>	<b>9</b>
<b>I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>I.1. Bedarf an Knochenersatz .....</b>	<b>11</b>
<b>I.2. Anforderungen an Knochenersatzmaterialien .....</b>	<b>12</b>
<b>I.3. Notwendigkeit von Antibiotikaträgersystemen in der antibiotischen         Behandlung von Knocheninfektionen.....</b>	<b>12</b>
<b>I.4. Ostim® - Nanokristalliner Hydroxylapatit .....</b>	<b>14</b>
<b>II. LITERATURÜBERBLICK.....</b>	<b>15</b>
<b>II.1. Die Biologie des Knochens .....</b>	<b>15</b>
<b>II.2. Die Biologie des Knochenersatzes.....</b>	<b>18</b>
<b>II.3. Möglichkeiten des Knochenersatzes .....</b>	<b>23</b>
II.3.1. Autogene Knochentransplantate.....	23
II.3.2. Allogene Knochentransplantate .....	24
II.3.3. Hydroxylapatitkeramiken (HA-Keramiken).....	27
II.3.3.1. Bovine Hydroxylapatitkeramiken .....	30
II.3.3.2. Synthetische Hydroxylapatitkeramiken .....	31
II.3.3.3. Koralline Hydroxylapatitkeramiken .....	32
II.3.4. Hydroxylapatitkeramikkomposite .....	32
II.3.5. Hydroxylapatit-Kollagen-Kombinationen.....	33
II.3.6. Zemente .....	34
II.3.6.1. Biobon® (α-BSM®) .....	35
II.3.6.2. Cementek® .....	35
II.3.6.3. BoneSource® Classic Hydroxyapatite Cement/BVF.....	35
II.3.6.4. Calcibon® .....	36
II.3.6.5. Norian Skeletal-/Craniofacial Repair System (NSRS®/NCRS®).....	36
II.3.7. Ausblick.....	37

<b>II.4. Osteomyelitis und Ostitis .....</b>	<b>39</b>
II.4.1. Klassifikation, Erregerspektrum .....	39
II.4.2. Behandlungsstrategien – Einsatz von Antibiotikaträgersystemen .....	40
II.4.3. Biomaterialien als Antibiotikaträger in der Osteomyelitistherapie .....	42
II.4.3.1. Handelsübliche Präparate .....	43
<i>Polymethylmethacrylat</i> .....	43
<i>Kollagen</i> .....	44
<i>Calciumsulfat</i> .....	45
<i>PerOssa</i> <sup>®</sup> .....	46
II.4.3.2. Ausblick .....	47
<i>Nanokristalliner Hydroxylapatit</i> .....	47
<i>Biodegradable synthetische Polymere</i> .....	47
<i>Antibiotikabeladene Hydroxylapatitkeramiken</i> .....	48
<i>Knochen transplantate</i> .....	48
<b>III. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>49</b>
<b>III.1. Versuchstiere</b> .....	<b>49</b>
<b>III.2. Ostim</b> <sup>®</sup> .....	<b>49</b>
<b>III.3. Clindamycin</b> .....	<b>50</b>
III.3.1. Herkunft, Struktur und physiko-chemische Eigenschaften .....	51
III.3.2. Wirkmechanismen .....	51
III.3.3. Wirkungsspektrum .....	53
III.3.3.1. Empfindliche Erreger .....	56
III.3.3.2. Resistenzen.....	57
III.3.4. Pharmakokinetik .....	57
III.3.5. Metabolisierung und Ausscheidung .....	58
III.3.6. Unerwünschte Wirkungen .....	58
<b>III.4. Versuchsaufbau</b> .....	<b>59</b>
<b>III.5. Operationsvorbereitungen und Anästhesie</b> .....	<b>60</b>
<b>III.6. Operationsmodell</b> .....	<b>60</b>
III.6.1. Diamond Bone Cutting System.....	63
<b>III.7. Postoperative Maßnahmen</b> .....	<b>64</b>

<b>III.8. Postoperative Blutentnahme.....</b>	<b>65</b>
<b>III.9. Polychrome Sequenzmarkierung .....</b>	<b>65</b>
<b>III.10. Euthanasie.....</b>	<b>66</b>
<b>III.11. Röntgendokumentation .....</b>	<b>67</b>
<b>III.12. Aufarbeitung der Femura.....</b>	<b>68</b>
<b>III.13. In-vitro–Elutionsversuch.....</b>	<b>69</b>
<b>III.14. Clindamycinkonzentrationsbestimmungen .....</b>	<b>70</b>
III.14.1. Nährboden und Testkeim.....	72
III.14.2. Probenaufarbeitung .....	72
III.14.3. Referenzlösungen.....	73
<b>III.15. Mikroskopische Untersuchungen .....</b>	<b>74</b>
III.15.1. Die Trenn-Dünnschlifftechnik nach Donath und Breuner.....	74
III.15.2. Toluidinfärbung .....	75
III.15.3. Mikroskopie .....	76
<b>III.16. Graphische Darstellungen und Bilddokumentation.....</b>	<b>76</b>
<b>III.17. Statistische Auswertung.....</b>	<b>77</b>
<b>IV. ERGEBNISSE.....</b>	<b>78</b>
<b>IV.1. Klinische Befunde.....</b>	<b>78</b>
IV.1.1. Gruppe 1 und 2 (Ostim®).....	78
IV.1.2. Gruppe 3 und 4 (Ostim® plus) .....	78
<b>IV.2. Makroskopische Befunde.....</b>	<b>79</b>
<b>IV.3. Hellfeldmikroskopische Ergebnisse.....</b>	<b>81</b>
IV.3.1. Ostim® .....	81
IV.3.1.1. Gruppe 1 (Ostim® - Zwei Wochen postoperativ).....	81
IV.3.1.2. Bilddokumentation – Hellfeldmikroskopie Gruppe 1.....	83
IV.3.1.3. Gruppe 2 (Ostim® - Vier Wochen postoperativ).....	90
IV.3.1.4. Bilddokumentation – Hellfeldmikroskopie Gruppe 2.....	91

IV.3.2. Ostim <sup>®</sup> plus 10/20 .....	99
IV.3.2.1. Gruppe 3 (Ostim <sup>®</sup> plus - Zwei Wochen postoperativ) ..	99
IV.3.2.2. Bilddokumentation – Hellfeldmikroskopie Gruppe 3.....	100
IV.3.2.3. Gruppe 4 (Ostim <sup>®</sup> plus - Vier Wochen postoperativ) .....	106
IV.3.2.4. Bilddokumentation – Hellfeldmikroskopie Gruppe 4.....	107
IV.3.3. Zusammenfassung der hellfeldmikroskopischen Ergebnisse.....	113
<b>IV.4. Fluoreszenzoptische Ergebnisse .....</b>	<b>117</b>
IV.4.1. Ostim <sup>®</sup> .....	117
IV.4.1.1. Gruppe 1 (Ostim <sup>®</sup> - Zwei Wochen postoperativ).....	117
IV.4.1.2. Bilddokumentation - Fluoreszenzmikroskopie Gruppe 1.....	117
IV.4.1.3. Gruppe 2 (Ostim <sup>®</sup> - Vier Wochen postoperativ).....	119
IV.4.1.4. Bilddokumentation - Fluoreszenzmikroskopie Gruppe 2.....	120
IV.4.2. Ostim <sup>®</sup> plus .....	122
IV.4.2.1. Gruppe 3 (Ostim <sup>®</sup> plus - Zwei Wochen postoperativ) .....	122
IV.4.2.2. Gruppe 4 (Ostim <sup>®</sup> plus - Vier Wochen postoperativ) .....	122
IV.4.2.3. Bilddokumentation - Fluoreszenzmikroskopie Gruppe 4.....	123
IV.4.2.4. Zusammenfassung der fluoreszenzoptischen Ergebnisse .....	124
<b>IV.5. Pharmakokinetische Untersuchungen.....</b>	<b>126</b>
IV.5.1. In-vitro-Elutionsversuch .....	126
IV.5.2. In-vivo-Untersuchungen .....	129
IV.5.2.1. Lokale Clindamycinkonzentrationen .....	129
IV.5.2.2. Postoperative Clindamycinserumspiegel .....	131
<b>V. DISKUSSION .....</b>	<b>133</b>
<b>V.1. Tier- und Operationsmodell .....</b>	<b>133</b>
<b>V.2. Knochenreaktion auf Ostim<sup>®</sup> in der Hellfeldmikroskopie .....</b>	<b>136</b>
V.2.1. Erschließungsmuster, Osteogenese und Biodegradation .....	136
V.2.2. Zelluläres Reaktionsmuster .....	141
V.2.3. Fasermatrix.....	144
V.2.4. Färbeverhalten .....	146
V.2.5. Unterschiede zwischen Ostim <sup>®</sup> und Ostim <sup>®</sup> plus.....	147
<b>V.3. Fluoreszenzoptische Ergebnisse .....</b>	<b>149</b>
<b>V.4. Klinische Anwendung.....</b>	<b>151</b>

<b>V.5. Ostim® plus als resorbierbares Antibiotikumträgersystem .....</b>	<b>153</b>
V.5.1. Auswahl von Clindamycin.....	153
V.5.2. Clindamycingewebekonzentrationen .....	157
V.5.3. Antibiotikaträgersysteme im pharmakokinetischen Vergleich .....	161
V.5.4. Serumspiegel.....	165
V.5.5. In-vitro-Freisetzungskinetik von Ostim® plus .....	166
 <b>VI. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>167</b>
 <b>VII. SUMMARY .....</b>	<b>168</b>
 <b>VIII. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>170</b>
 <b>IX. ANHANG .....</b>	<b>205</b>
IX.1. Postoperative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere .....	205
IX.2. Lokale Clindamycinkonzentrationen.....	206
IX.3. Postoperative Clindamycinserumkonzentrationen.....	206
IX.4. Rezepturen und Arbeitsabläufe .....	207
IX.4.1. Karnovskylösung... ..	207
IX.4.2. Phosphatpufferlösungen.....	207
<i>Phosphatpufferstammlösung 1-molar.....</i>	<i>207</i>
<i>Phosphatpuffer 1/15-molar .....</i>	<i>207</i>
IX.4.3. Toluidinblaufärbung.. ..	207
IX.5. Pathologischer Befundbericht.....	208
 <b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>211</b>
 <b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>212</b>



**ABKÜRZUNGEN, MAßEINHEITEN UND SYMBOLE**

a	Jahr
AG	Aktiengesellschaft
AB	Antibiotika
a. p.	anterior-posterior
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
ca.	circa
CFU	Colony Forming Unit
d	Tag
Dia	Diaphyse
DIN	Deutsches Institut für Normen e. V.
Epi	Epiphyse
et al.	und andere
etc.	et cetera
ev.	eventuell
Fa.	Firma
ff.	Folgeseiten
Gew%	Gewichtsprozent
ggf.	gegebenenfalls
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
H	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd
HA	Hydroxylapatit
i. m.	intramuskulär
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KV	Kilovolt
l	Liter

---

m	molar
M	Monat
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mAs	Milliamperesekunden
MBK	Minimale bakterizide Konzentration
Met	Metaphyse
mg	Milligramm
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHK 90	Minimale Hemmkonzentration für 90% der getesteten Stämme
ml	Milliliter
N	Normallösung
Nr.	Nummer
P	Phosphat
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
pH	Negativer 10-er-Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
R	Range
®	Registrierte Warenmarke
s.	siehe
s. a.	siehe auch
s. c.	subkutan
sog.	so genannt(e/s)
spp.	Spezies
s. u.	siehe unten
SD	Standardabweichung
u. a.	und andere bzw. unter anderem
VE	vollentionisiert
Vol%	Volumenprozent
w	Woche
z. B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
∅	Durchmesser, Durchschnitt(-lich), nicht nachweisbar
%	Prozent

# **I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG**

## **I.1. Bedarf an Knochenersatz**

Knöchernen Substanzdefekte, wie sie erblich, posttraumatisch oder nach chirurgisch-resezierenden Eingriffen auftreten können, erfordern in vielen Fällen die Anwendung von Knochenersatzverfahren, um eine definitive Heilung zu erzielen.

Transplantiertes körpereigenes Knochengewebe erzielt biologisch die besten Ergebnisse und ist als Goldener Standard allgemein anerkannt. Das hierbei am häufigsten angewandte Verfahren ist die autogene Spongiosaplastik mit Entnahme aus dem Beckenkamm des Patienten.

Die Nachteile des Verfahrens sind insbesondere das nicht zu umgehende Entnahmetrauma und die begrenzte Verfügbarkeit. Bei größeren Defekten kann deshalb eine mehrzeitige Materialgewinnung oder die Kombination mit anderen Knochenersatzformen erforderlich sein. Als solche stehen patientenfremder (allogener) menschlicher Spenderknochen, Rinderknochen (boviner Knochenersatz) sowie Präparate aus Korallen und synthetische Materialien zur Verfügung.

Allogene Knochen transplantate (menschliche Spenderknochen) weisen einerseits gute Einheilungsergebnisse auf, andererseits ist die Methode mit einem hohen technischen und ökonomischen Aufwand und einem Infektionsrisiko für Bakterien, Viren und Tumorzellen verbunden. Über eine zelluläre Sensibilisierung kann es bei nachfolgenden Schwangerschaften oder nach erneuten Allotransplantationen zu Unverträglichkeits- und Abstoßungsreaktionen kommen (Hofmann et al., 1997). Insbesondere aber vor dem Hintergrund einer möglichen HIV-Infektion muss deren Einsatz heute kritisch hinterfragt werden (Campbell und Li, 1999; Campbell et al., 1994; Campbell und Oakeshott, 1995; Diseases, 1988; Hernigou et al., 1998; Marx und Carlson, 1993; Mellonig et al., 1992; Pruss et al., 2002).

## **I.2. Anforderungen an Knochenersatzmaterialien**

Bovine, synthetische und aus Korallen hergestellte Knochenersatzmaterialien umgehen die genannten Nachteile der auto- und allogenen Transplantate. Sie weisen jeweils ein individuelles Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil auf, worauf im Rahmen dieser Arbeit noch näher eingegangen wird.

Das ideale Knochenersatzmaterial sollte folgende Eigenschaften besitzen:

- Gute Verträglichkeit (Biokompatibilität)
- Förderung der Knochenneubildung (Osteogenes Potential)
- Einfache Applikation
- Formschlüssige Defektfüllung
- Mechanische Stabilisierung
- Vollständiger Abbau (idealerweise zeitlich an knöcherne Heilung angepasst)
- Ohne Infektionsrisiko
- Antigenfreiheit (keine Sensibilisierungs-/Abstoßungsreaktion)
- Niedrige Kosten

## **I.3. Notwendigkeit von Antibiotikaträgersystemen in der antibiotischen Behandlung von Knocheninfektionen**

Knochengewebe ist durch seine bradytrophe Stoffwechselsituation für systemisch applizierte Antibiotika schwer erreichbar. Im Rahmen von chronischen bakteriellen Infektionen können sich Durchblutungs- und Diffusionsbarrieren, bakterielle Glykokalyxfilme (Alam et al., 1990) und Nekrosen (Norden, 1985) ausbilden, die weder für die körpereigene Immunabwehr noch für systemisch applizierte Antibiotika zugänglich sind.

Eine chirurgische Intervention mit Entfernung von avitalem Gewebe und Fremdmaterial, Obliteration von Toträumen sowie eine lokale antimikrobielle Therapie stellt in diesem Fall die entscheidende Therapiemaßnahme dar.

Durch die Implantation von Antibiotikaträgersystemen in das Infektionsgebiet können höhere lokale Gewebekonzentrationen bei gleichzeitig niedrigeren systemischen Wirkstoffspiegeln und damit geringeren Nebenwirkungen erzielt werden (Blaha et al., 1993; Gitelis und Brebach, 2002; Kanellakopoulou et al., 2000; Kanellakopoulou und Giamarellos-Bourboulis, 2000; Letsch et al., 1993; Nelson, C. L. et al., 1993; Stemberger et al., 1997; Wahlig, 1980, 1982; Wahlig und Dingeldein, 1980, 1987; Wahlig et al., 1978a, 1979; Walenkamp, 1983, 1989; Walenkamp et al., 1998; Walenkamp und van Rens, 1982; Walenkamp und Vree, 1981; Walenkamp et al., 1986; Walenkamp et al., 1981).

Anfänglich instillierte man die Antibiotika unbehandelt in das Knochengewebe, womit nur für kurze Zeit ausreichend hohe Wirkstoffspiegel erzielt wurden. Durch die Kopplung an Trägermaterialien wie Blut, Fibrin, Gips und Knochenzement realisierte man eine zeitlich prolongiertere Freisetzung und bessere klinische Ergebnisse (Bucholz, H. W. und Engelbrecht, 1970; Klemm, 1979b; Redl et al., 1983).

Antibiotikaträgersysteme sollten neben einer guten Biokompatibilität in erster Linie eine geeignete Pharmakokinetik mit ausreichend hoher und langer Wirkstofffreisetzung aufweisen.

Eine vollständige Abbaubarkeit ermöglicht es, auf eine operative Entfernung der Implantate zu verzichten.

Eine Förderung der Knochenneubildung (osteogene Wirkung) beschleunigt die Defektheilung bei oft gleichzeitig bestehenden knöchernen Substanzdefekten.

#### **I.4. Ostim<sup>®</sup> - Nanokristalliner Hydroxylapatit**

Hydroxylapatit ist eine nanokristalline, nadelförmige Calciumphosphatverbindung und Hauptbestandteil des natürlichen Knochens. Der neu entwickelte, synthetisch hergestellte Hydroxylapatit, Ostim<sup>®</sup>, weist im Gegensatz zu den bisher häufig verwendeten Hydroxylapatitkeramiken Kristalle auf, die in Form und Größe den natürlichen weitestgehend ähneln.

Die vorliegende Arbeit untersuchte dessen Eignung als Knochenersatzmaterial und Antibiotikumträgersystem in Kombination mit Clindamycin.

Hierzu erfolgten hellfeldmikroskopische, fluoreszenzoptische und pharmakokinetische Untersuchungen nach Implantation in den Femurmarkraum von 26 Weißen Neuseeländerkaninchen. Ergänzend fanden In-vitro-Versuche zur Freisetzungskinetik der Substanz statt.

Von besonderem Interesse war dabei die Verträglichkeit von Ostim<sup>®</sup> für den Gesamtorganismus und das histologische Reaktionsmuster mit Aussagen über dessen Gewebeverträglichkeit, Abbaubarkeit sowie Einflussnahme auf die Knochenneubildung.

Pharmakokinetisch stellte sich die Frage, ob Ostim<sup>®</sup> in Kombination mit Clindamycin ausreichend hohe und lang anhaltende lokale Clindamycinkonzentrationen zur Behandlung bakterieller Knochenentzündungen erreichen würde.

## II. LITERATURÜBERBLICK

### II.1. Die Biologie des Knochens

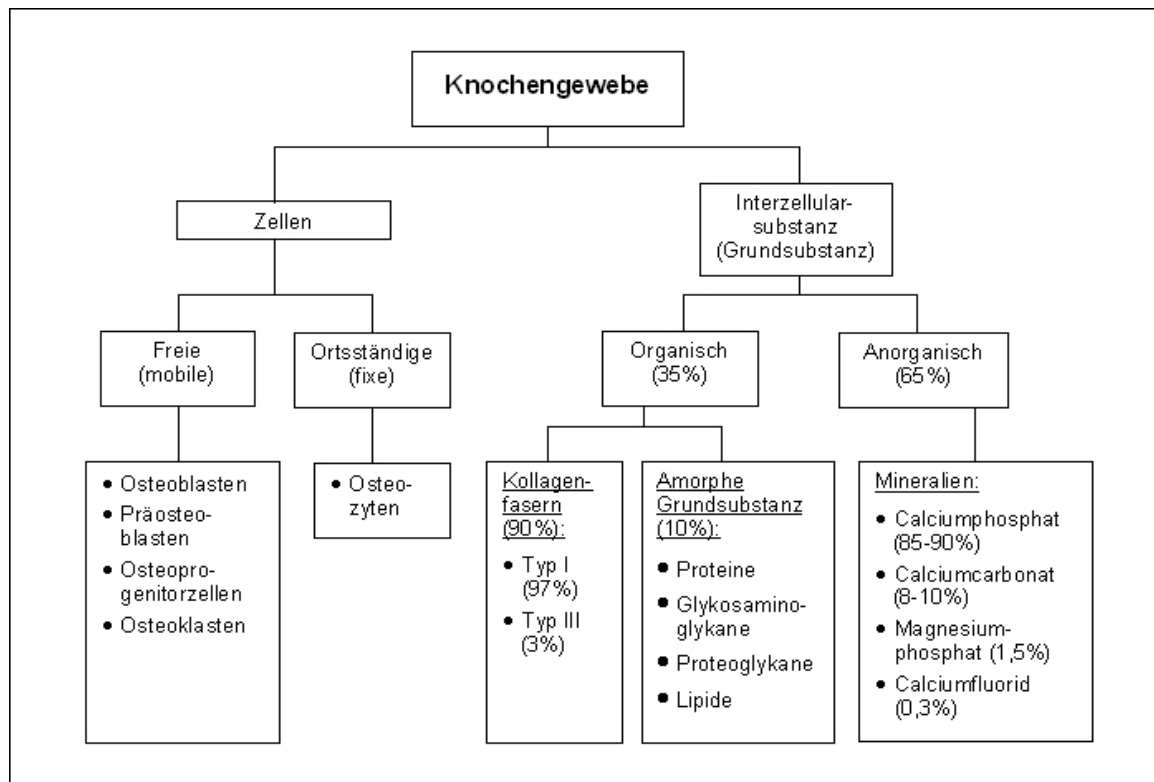


Abbildung 1: Aufbau von Knochengewebe. Quelle: Eigener Entwurf. Daten in Anlehnung an: JUNQUEIRA und CARNEIRO (1996) sowie SAJONSKI und SMOLLICH (1990).

Knochengewebe entwickelt sich aus mesenchymalem Bindegewebe. Es besteht aus Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien und einer Interzellulärsubstanz aus organischen und anorganischen Bestandteilen (Kollagenfasern, Wasser, Mineralien u. a.). Die Zellen des Knochens entwickeln sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen. Determinierte Osteoprogenitorzellen (*determined osteogenic precursor cells* - DOPC) bzw. induzierbare Osteoprogenitorzellen (*inducible osteogenic precursor cells* - IOPC) differenzieren sich zu Präosteoblasten, aus denen wiederum Osteoblasten und schließlich Osteozyten entstehen.

Osteoblasten sind im Gegensatz zu Präosteoblasten nicht mehr teilungsfähig und sind für die Synthese von organischen Bestandteilen der Knochenmatrix und der Mineralien verantwortlich. Abhängig von ihrer Stoffwechselaktivität sind sie elliptisch (geringe Aktivität) bis kuboid (große Syntheseleistung - Durchmesser: ca. 20-30 µm) geformt (Jackson, 1957) mit meist exzentrisch gelegenem Zellkern.

Bei der Bildung von Geflechtknochen liegen sie diffus verteilt vor und produzieren allseitig perizellulär die extrazelluläre Knochenmatrix. Auf Lamellenknochenoberflächen bilden sie einschichtige epithelartigen Zellverbände, sog. Osteoblastenlayer, und produzieren durch eine polarisierte Matrixsezernation knochenständige Osteoidsäume (ca.  $1\text{ }\mu\text{m/Tag}$  = *appositional bone formation rate* – ABR) (Frost, 1973). Nach Abschluss der Synthesephase flachen die Zellen ab und übernehmen als Knochenbelegzellen (*bone lining cells*) regulative Aufgaben im Rahmen des Knochenumbaus.

Aus den Osteoblasten gehen die geringer stoffwechselaktiven, weniger basophilen, flachen, dendritischen Osteozyten hervor, die in erster Linie für den Erhalt des Knochens verantwortlich sind. Sie sind vollständig in mineralisierte Knochensubstanz eingebettet und stehen über fingerförmige Zellfortsätze und Knochenkanälchen (*Canaliculi ossei*) untereinander in direktem Kontakt (Cooper et al., 1966). Unter dem Einfluss von Zytokinen und unterschiedlichen physikalisch-chemischen Reizen können sich Osteozyten erneut in Osteoblasten und Osteoklasten differenzieren.

Osteoklasten sind für die Knochenresorption zuständig. Sie weisen einen Zelldurchmesser von ca. zehn bis  $100\text{ }\mu\text{m}$  auf und enthalten durchschnittlich etwa zehn bis 20, selten bis zu 100 Kerne pro Zelle. Bezüglich der Herkunft wird sowohl eine Entwicklung aus mesenchymalen Vorläuferzellen, Osteozyten, Osteoblasten und Fibrozyten als auch aus dem mononukleären Phagozytensystem des Blutes (Monozyten, Makrophagen) diskutiert (Bonucci, 1981).

Die knochenangrenzende resorptionsaktive Zellmembran der Osteoklasten ist als oberflächenvergrößerndes Faltensystem ausgebildet (*ruffled border*), das durch die Sezernation von Salzsäure, Karboanhydrase, ATP-ase, Phosphatasen, Zytochromoxidasen u. a. Substanzen den Knochenabbau ermöglicht (Cooper et al., 1966).

Die von Osteoblasten gebildete Knochenmatrix setzt sich aus einem organischen Anteil (ca. 35%) und anorganischen Mineralien (ca. 65%) zusammen. Kollagen (zu ca. 97% Typ I, ca. 3% Typ III) bildet mit ca. 90% den Hauptanteil der organischen Phase. Daneben finden sich Proteine wie Osteonektin und Osteocalcin, Glykosaminoglykane, Proteoglykane (1-2%) sowie Lipide (5-10%).



Die anorganische Knochengrundsubstanz besteht vornehmlich aus Calciumphosphat (85-90%), Calciumcarbonat (8-10%), Magnesiumphosphat (1,5%) und Calciumfluorid (0,3%). Die Mineralien liegen in Form von kristallinen Raumgittern vor und sind den Kollagenfasern sowohl außen angelagert, als auch in sie integriert. Den Hauptbestandteil bilden die nadelförmigen Kristalle des Calciumphosphates, der Hydroxylapatit, mit Abmessungen von ca. 20 bis 49 nm Länge und zwei bis drei nm Breite.

Die Knochenneubildung (Osteogenese) erfolgt meist als desmale Ossifikation direkt aus mesenchymalem Bindegewebe. Seltener findet eine indirekte Knochenneubildung statt, bei der zunächst hyaliner Knorpel gebildet und nachfolgend durch Knochengewebe ersetzt wird (chondrale Ossifikation). In beiden Fällen sezernieren Osteoblasten zunächst eine extrazelluläre, nicht mineralisierte organische Matrix, das sog. Osteoid, sowie in Matrixvesikel eingeschlossene mineralische Calciumkomplexe. Nach Ruptur der Vesikel fungieren freigesetzte Calciumphosphatpräzipitate als Nukleationszentren (*calcification nodules*) für Kristallisationsprozesse in der Kollagenfasermatrix des Osteoids. Bei der lamellären Knochenneubildung ist diese Mineralisationsfront hellfeldmikroskopisch mittels Toluidinfärbung als dunkles Band (*reversal band*) sichtbar.

Gemäß strukturellen und biomechanischen Merkmalen unterscheidet man Geflecht- und Lamellenknochen. Ersterer verfügt über einen höheren Anteil an Osteozyten, einem geringeren Mineraliengehalt und zufällig angeordneten Kollagenfaserbündeln. Er ermöglicht eine schnelle Knochenneubildung mit vorwiegender Stabilität gegen Zug- und Scherkräfte. Lamellenknochen verfügt über streng nach statisch-funktionellen Gesichtspunkten orientierte parallel angeordnete Kollagenfasern (Knochenlamellen) und weist auf Grund eines höheren Mineralsalzgehaltes zusätzliche Widerstandskraft gegen Druckkräfte auf.

In der Regel wird zunächst das Stadium des Geflechtknochens durchlaufen, welcher nachfolgend durch Lamellenknochen ersetzt wird.

## **II.2. Die Biologie des Knochenersatzes**

Zahlreiche histologische Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Inkorporationsverhalten von Knochentransplantaten und -ersatzmaterialien (Aaboe et al., 2000; Al Ruhaimi, 2001; Berglundh und Lindhe, 1997; Bucholz, R. W., 2002; Caulier et al., 1995; Cornell und Lane, 1998; Dalkyz et al., 2000; Doherty et al., 1994; Du et al., 1998; Feifel, 2000; Frayssinet et al., 2000; Karlsson, 1999; Lohmann et al., 2001; Rueger, 1996; Werber et al., 2000).

Neben materialspezifischen Besonderheiten lassen sich dabei im Wesentlichen fünf biologische Reaktionsstufen unterscheiden:

1. Hämatombildung mit Adhärenz und Degranulation von Thrombozyten und Makrophagen an Wund-/Materialoberflächen und Freisetzung von Chemomediators (Zytokine, Wachstumsfaktoren: *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Transforming Growth Factor-B* (TGF- $\beta$ ) u. a.) (Goldberg, V. M. und Stevenson, 1987, 1993)
2. Initiale Entzündungsreaktion (Immigration von Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen etc.) und konsekutive mediatorvermittelte Migration, Proliferation und fibrovaskuläre Differenzierung von Mesenchymzellen (Goldberg, Shaffer et al. 1987; Goldberg und Stevenson 1987; Heiple, Goldberg et al. 1987; Reddi, Wientroub et al. 1987)
3. Vaskularisation (Antransport von Zellen, Nährstoffen, Sauerstoff, Puffern) (Braun, 1992; Dambe et al., 1978; Goldberg, V. M. et al., 1987; Goldberg, V. M. und Stevenson, 1987, 1993; Heiple et al., 1987)
4. Ausdifferenzierung von Osteoblasten/-klasten und/oder Chondroblasten aus Mesenchymzellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien – (Asahina et al., 1993; Kubler, 1997; Matsumoto et al., 1999; Minguell et al., 2000; Nordstrom et al., 1999; Ohgushi et al., 1993; Oreffo et al., 1998; Stringa et al., 1995; Urist et al., 1969) - ev. auch aus Fibroblasten (Rutherford et al., 2002)
5. Knochenneubildung und definitive Defektheilung

Die knöcherne Einheilung von Implantaten stellt ein wechselseitiges Geschehen dar. Es wird neben den physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften des Implantates (Biokompatibilität, osteoblastäre, -konduktive, -induktive Potenz, Antigenität, Resorptionsverhalten, pH-Veränderung etc.) in nicht zu unterschätzendem Maße von den Verhältnissen des Implantatbettes bestimmt. Hierzu zählen beispielsweise Durchblutung (Contzen, 1989), Stoffwechselaktivität (Lexer, 1911), (Primär-)Stabilität (Bucholz, R. W. et al., 1987) und der Implantat-Knochen-Kontakt (Formschluss). Letztlich übt auch der Allgemeinzustand des Patienten einen Einfluss aus (Axhausen, G., 1908 a, 1908 b; Axhausen, W., 1967; Donath und Kirsch, 1986; Kregelez et al., 1979; Nagashimi et al., 1995; Vitalli, 1965).

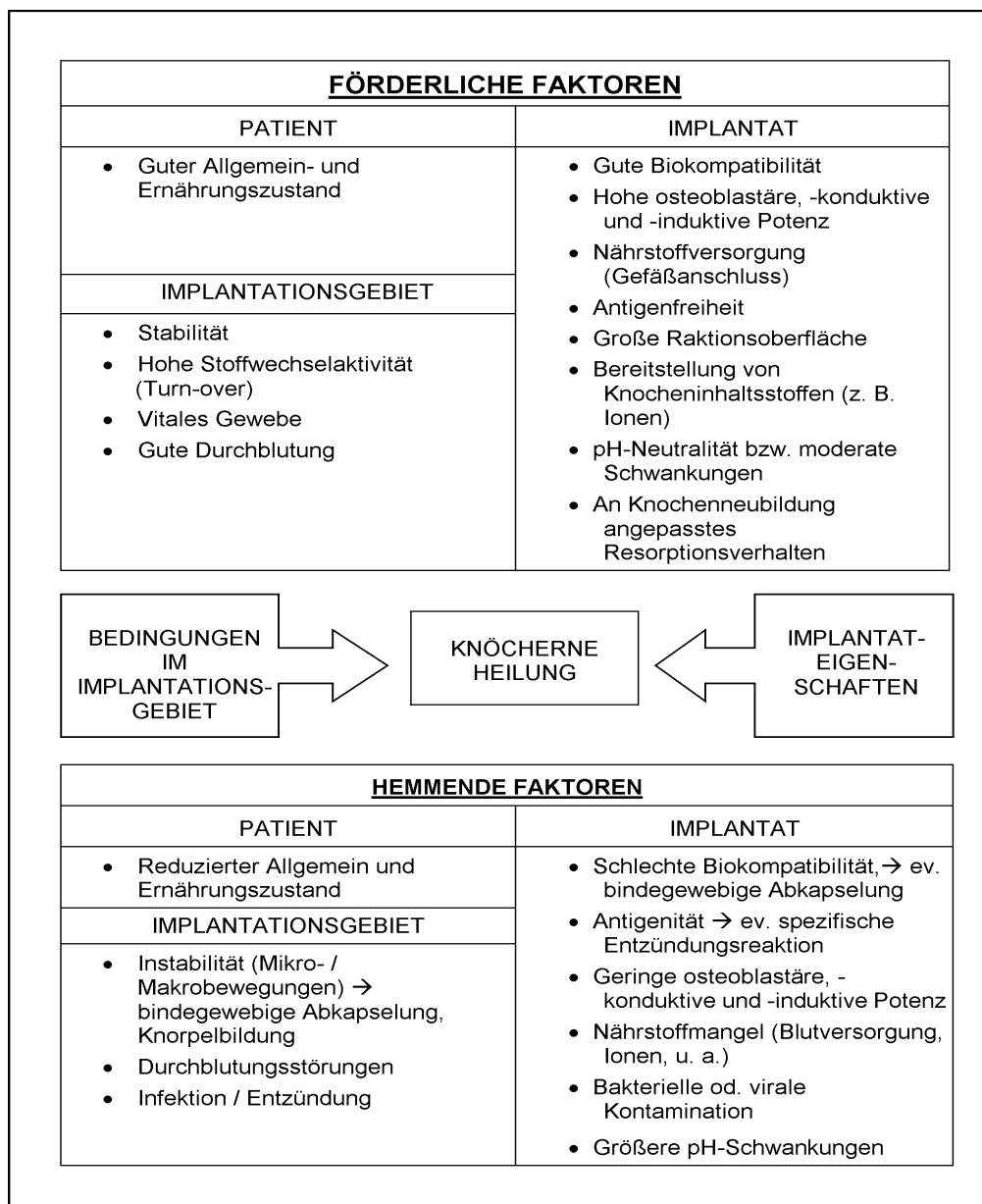


Abbildung 2: Einflussfaktoren auf die Biointegration von Knochentransplantaten und –ersatzmaterialien. Quelle: Eigener Entwurf.

Wir verfügen derzeit über eine Vielzahl von Möglichkeiten für die Therapie von knöchernen Substanzdefekten. Das patienteneigene autogene Knochentransplantat gilt bezüglich Biokompatibilität, Knochenneubildungsrate und Einheilungsgeschwindigkeit als Goldener Standard des Knochenersatzes. Als nachteilig werden jedoch die unumgängliche Entnahmeoperation sowie die begrenzte Verfügbarkeit empfunden. Insbesondere bei größeren Defekten kommen deshalb Biomaterialien, wie patientenfremder menschlicher (allogener) Knochen sowie verschiedene Knochenersatzmaterialien zum Einsatz.

Knochenersatzmaterialien bestehen per definitionem aus nicht lebendem Material und übernehmen in biologischen Systemen medizinische Funktionen (Otter et al., 1988; Roesgen, 1990). Ihre Biokompatibilität kann nach OSBORN (1979) wie folgt beschrieben werden:

- bioaktiv
- bioinert und
- biotolerant

Bioaktive Stoffe bestehen dabei aus chemischen Verbindungen, die im Organismus selbst vorhanden sind und postoperativ eine spezifische erwünschte biologische Gewebereaktion auslösen. Bezogen auf Knochenersatzstoffe kommt es durch eine chemische Bindung zwischen Implantat und Knochen zur Ausbildung einer Verbundosteogenese.

Bioinerte Materialien sind weitgehend resorptionsstabil und lösen im Kontaktgewebe nahezu keine Reaktionen aus. Sie zeichnen sich durch eine ausgezeichnete Biokompatibilität, ohne unerwünschte Gewebeworgänge aus und heilen in Form einer Kontaktosteogenese ein.

Biotolerante Werkstoffe führen zu einer bindegewebigen Abkapselung im Sinne einer Distanzosteogenese, die einen Kraftschluss zwischen Implantat und Knochen unmöglich macht.

Knochentransplantate bzw. -ersatzmaterialien können eine Knochenneubildung im Wesentlichen über drei Wirkmechanismen beeinflussen (Bauer und Muschler, 2000):

- Osteoblastäre Osteogenese
- Osteokonduktive Osteogenese
- Osteoinduktive Osteogenese

Osteoblastäre Materialien enthalten vitale Zellen, die zur Knochenbildung fähig sind (primär osteoblastische Knochenneubildung) oder sich in solche differenzieren können (sekundär osteoblastische Knochenneubildung).

Osteokonduktive Stoffe entfalten eine Leitschienenfunktion für vom Wirtsknochen aus einwachsendes fibrovaskuläres Binde- und Knorpelgewebe (Chang, B. S. et al., 2000; LeGeros, 2002).

Osteoinduktivität beschreibt die Fähigkeit, undeterminierte Mesenchymzellen zur Differenzierung in osteo- bzw. chondroblastische Zellen anzuregen (Reddi et al., 1987; Schweiberer et al., 1986; Umemura et al., 1989) und eine experimentell überprüfbare heterotope Knochenbildung beispielsweise in subkutanem Bindegewebe oder Muskulatur anzuregen.

Nach der Theorie von URIST et al. sind für eine Osteoinduktion insbesondere nichtkollagene Matrixproteine verantwortlich, wie beispielsweise das von ihnen 1983 isolierte *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) (Urist, DeLange et al., 1983; Urist et al., 1969; Urist et al., 1982; Urist et al., 1977; Urist, Sato et al., 1983). REDDI (1981), REDDI et al. (1987) sowie SCHWEIBERER et al. (1986) betonten den kaskadenartigen Reaktionscharakter der biochemischen und zellulären Vorgänge mit initialer Chemotaxis, Mitose und Zelldifferenzierung.

Neben BMP (Wozney et al., 1990) sind uns heute zahlreiche osteoinduktive Stoffe, sog. Osteogenine (Lacroix, 1945; Reddi et al., 1987) und knochenbildungsfördernde (osteogene) Faktoren bekannt. Zu diesen zählen Osteopontin (Liao et al., 2002), Osteocalcin, Osteonectin, *Osteogenetic Protein 1* (OP-1) (Asahina et al., 1993; Bosse et al., 1993; Muehleman et al., 2002), TAK-778 (Kato et al., 2001),

*Osteogenetic Bone Sialoprotein* (Bosse et al., 1993; Ryden et al., 1989), Hyaluronsäure (Sasaki und Watanabe, 1995), *Skeletal Growth Factor* (Farley und Baylink, 1982), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) (Lee, Y. M. et al., 2000), *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (Gospodarowicz et al., 1986; Ono, Tateshita et al., 1996), *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) (Arnaud, 2000; Inaba et al., 1996; Joyce et al., 1990), *Insulin-like Growth Factor I* (IGF I) (Schmid et al., 1998), Phosphoserin, Fibronectin (Daculsi et al., 1999), Decorin (Bosse et al., 1993), Interleukin-1b (Mahy und Urist, 1988), Parathormon, (Reddi und Sullivan, 1980), Prostaglandin E1/2 (Hulth, 1989; Ono, Inoue et al., 1996), Prostaglandin 100 (Bosse et al., 1993) und viele mehr.

Eine genaue Darstellung der biochemischen Abläufe würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten. Es sollen deshalb nur punktuell einige Zusammenhänge aufgezeigt werden.

Basischer *Fibroblast Growth Factor* (FGF) fördert die Angiogenese (Gospodarowicz et al., 1986), *Transforming Growth Factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) wirkt chemotaktisch auf potentiell knochenbildungsfähige Zellen (Joyce et al., 1990). Basischer FGF, FGF- $\beta$  und BMP sind proliferationssteigernd. BMP-2 und -3 fördern insbesondere die Ausdifferenzierung von Osteoblasten (Wang, E. A. et al., 1990). *Insulin-like Growth Factor 1* (IGF-1) erhöht zelluläre Syntheseleistungen.

Alleine oder in Kombination mit Knochenersatzmaterialien sind diese Mediatoren in der Lage ossäre Heilungsvorgänge zu beschleunigen. Auf Grund der damit zusammenhängenden medizinischen und sozioökonomischen Bedeutung sind sie seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen (Arnaud, 2000; Kamegai et al., 1994; Kilian et al., 2002; Lee, D. D. et al., 1999; Miki et al., 2000; Ono, Tateshita et al., 1996; Wang, D. et al., 1997; Xu et al., 1997).

### **II.3. Möglichkeiten des Knochenersatzes**

Neben autologen und allogenen Knochentransplantaten werden verschiedene Calciumphosphatkeramiken (Hydroxylapatit (HA), Tricalciumphosphat (TCP), biphasische HA/TCP), Keramik-Kollagen-Kombinationen von xenogener und halb-synthetischer Herkunft, Glaskeramiken, Zemente (Ca-P, PMMA etc.), Biogläser u. a. eingesetzt. Eine einheitliche Einteilung der Knochenersatzmaterialien existiert derzeit nicht. Die Betrachtung aller Knochenersatzformen würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit überschreiten, sodass im Weiteren lediglich auf Materialien mit Hydroxylapatit als Hauptinhaltsstoff eingegangen wird.

Auf Grund stark variierender Versuchsanordnungen (Versuchs-/ Tier-/ Operationsmodell, Implantatgröße, Nachbeobachtungszeiten etc.) werden Vergleiche zwischen den Studien zwar erschwert, dennoch ergeben sich wichtige Aussagen zu Biokompatibilität, Integrationsverhalten und osteogener Potenz der einzelnen Materialien.

#### **II.3.1. Autogene Knochentransplantate**

Wir unterscheiden spongiöse und kortikale sowie vaskularisierte und nicht vaskularisierte patienteneigene Transplantate. Das Einwachsverhalten differiert zwischen diesen verschiedenen Formen beträchtlich und wird neben den strukturellen Eigenschaften (kortikal, spongiös) vor allem vom Vaskularisationsgrad bestimmt (Goldberg, M. et al., 1991). Eine bestmögliche Inkorporation, mit schneller knöcherner Integration und hoher mechanischer Stabilität wird mit anastomosierten Grafts erreicht (Goldberg, V. M. et al., 1987; Klein, L. et al., 1991; Weiland, Phillips et al., 1984). Hierbei können bis zu 90% der transplantierten Osteozyten vital erhalten bleiben und eine primäre osteoblastäre Osteogenese ermöglichen (Axhausen, G., 1908 a, 1908 b; Axhausen, W., 1967).

Das sehr viel häufiger angewandte Verfahren ist die nicht vaskularisierte Spongiosaplastik, bei der die Mehrzahl der Zellen ischämie- und apoptosebedingt abstirbt. Am widerstandfähigsten erweisen sich mesenchymalem Progenietorzellen, die sich postoperativ unter dem Einfluss von osteoinduktiven Faktoren aus dem

Implantatbett oder dem Transplantat selbst zu osteogenen Zellen differenzieren können (sekundär osteoblastische Osteogenese) (Doi et al., 1977; Minguell et al., 2000; Urist, DeLange et al., 1983). Der Erhalt des zellulären Reaktionsvermögens mit der Möglichkeit einer osteoblastischen Osteogenese ist maßgeblich für die hohe osteogene Potenz der autogenen Transplantate verantwortlich (Bauer und Muschler, 2000).

Eine vor allem bei spongiösen Transplantaten zu findende Wirkungsweise beruht auf einer osteokonduktiven Leitschienenfunktion für vom Lagerknochen aus einsprossendes fibrovaskuläres Gewebe und einwandernde Mesenchymzellen. Letztere differenzieren sich zu Osteoblasten und –klasten (Goldberg, V. M. und Stevenson, 1987) mit parallel stattfindender osteoblastärer appositioneller Osteoidsezeration und osteoklastärem Remodeling, was AXHAUSEN mit dem Begriff der „schleichenden Substitution“ (*creeping substitution*) charakterisierte (Axhausen, G., 1908 a, 1908 b; Axhausen, W., 1967). Bei kompakten Transplantaten geht der beschriebenen Osteokonduktion eine osteoklastäre Erschließung voraus, was mit einer zeitlichen Verzögerung verbunden ist (Goldberg, V. M. und Stevenson, 1987).

Insgesamt ähnelt die Einheilung von autologen Transplantaten dem physiologischen Heilungsverlauf nach Knocheninfarkten (Albrektsson, 1980; Axhausen, W., 1967; Burchardt, 1983; Doi et al., 1977; Goldberg, V. M. und Stevenson, 1987; Kubler, 1997; Schnettler, 1992; Springfield, 1987; Young et al., 1999).

### **II.3.2. Allogene Knochentransplantate**

Allogene Knochentransplantate werden aus langen Röhrenknochen von Multiorganspendern hergestellt. Durch Kryokonservation (Gefriertrocknung) werden zelluläre Bestandteile unter Erhalt osteoinduktiver Matrixproteine deaktiviert und die Biointegration durch Minderung der Antigenität verbessert (Goldberg, V. M. und Stevenson, 1987).



Ihre Wirkung entfalten die Präparate durch Osteokonduktion sowie eine geringe Osteoinduktion (Goldberg, V. M., 2000; Lohmann et al., 2001; Sun et al., 1998). Eine osteoblastische Osteogenese wie wir sie von Autotransplantaten kennen, ist auf Grund fehlender vitaler Zellen nicht möglich.

Die ossäre Biointegration beginnt am Lagerknochen-Transplantat-Interface und schreitet durch appositionelles Knochenwachstum entlang der Trabekel zum Transplantatzentrum hin fort (Gunther et al., 1998; Schnettler, 1992).

Inwieweit eine vollständige Durchbauung der Präparate stattfindet, hängt von den Implantateigenschaften, wie Größe, Struktur (spongiös, kortikal) und Vorbehandlung (frisch, konserviert) sowie den Bedingungen des Implantationsbettes (HLA-Match/-Mismatch, Turn-over, Durchblutung, Stabilität etc.) ab.

GUNTHER et al. (1998) beobachteten beispielsweise bei kryokonservierten spongiösen Allotransplantaten im femorokondylären Bohrlochmodell (Ø 5,5 mm; Tiefe: 13 mm) bei Kaninchen nach vier bis sechs Wochen eine vollständige knöcherne Durchbauung der spongiösen Transplantate. Nach zwölf Wochen waren die avitalen Knochentrabekel weitestgehend durch neuen Knochen ersetzt worden. In massiven humanen Allotransplantaten fanden dagegen ENNEKING und MINDELL (1991) nach fünfjähriger Implantation lediglich in der Peripherie (äußere 20%) knochenbildende und -resorbierende Prozesse; während das Zentrum azelluläres nekrotisches Gewebe enthielt.

GOLDBERG und STEVENSON (1987), SCHNETTLER (1992) und VIROLAINEN et al. (1995) zeigten in vergleichenden tierexperimentellen Untersuchungen von auto- und allogenen Transplantaten eine verzögerte Einheilung für das Allotransplantat auf und erklärten dies mit einer immunogenen Entzündungsreaktion. GOLDBERG und STEVENSON (1987) beobachteten dabei zwei Wochen postoperativ das Einwandern von mononukleären Zellen sowie eine perivaskuläre Entzündung mit Verschluss und Degeneration der neu eingesprossenen Gefäße.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch FRIEDLAENDER und HOROWITZ (1987, 1991, 1992), HALLORAN et al. (1979), STEVENSON (1987) und STEVENSON et al. (1996). Durch den Nachweis von transplantatspezifischen humoralen Antikörpern und einer MHC-abhängigen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Aktivierung bekräftigten diese die immunogene These der Inflammation.

Ungeachtet dieser Nachweise einer immunogenen Reaktion konnten AHO et al. (1998), FRIEDLAENDER (1983) und MUSCOLO et al. (1987) keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen HLA-Kompatibilität bzw. Anti-HLA-Antikörpern und knöcherner Integration bzw. klinischem Verlauf feststellen.

Dagegen wiesen LEE, M. Y. et al. (1997) auf die Bedeutung einer nachweislich stattfindenden HLA-Sensibilisierung im Zusammenhang mit möglichen Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin hin. Eine Antikörperbildung im ABO- und Rhesus-System kann ferner im Rahmen einer nachfolgenden Schwangerschaft die Ausbildung eines Morbus haemolyticus neonatorum begünstigen (Friedlaender, 1983; Mankin et al., 1983; Muscolo et al., 1987).

Ein weiterer Nachteil besteht in den nicht unbeträchtlichen Kosten von Knochenbanken für Spender- und Transplantatuntersuchungen, Empfänger-screening, MHC-/HLA-Untersuchungen, Asservierungskosten u. a. (Campbell und Oakeshott, 1995; Stutzle et al., 1991; Tomford und Mankin, 1999; Vilain und Courtmans, 2000).

Darüber hinaus besteht insbesondere bei ausschließlich gefrorenen oder gefriergetrockneten Produkten ein potentielles Übertragungsrisiko für Tumorzellen, Bakterien, Viren wie HIV, Hepatitis und Cytomegalie (Hernigou et al., 1998) sowie Prionen (*Creutzfeldt-Jacob-Disease*) (Campbell et al., 1994; Diseases, 1988; Hernigou et al., 1998; Mankin et al., 1983; Marx und Carlson, 1993; Mellonig et al., 1992; Tomford et al., 1981; Veen MR, 1991). Durch chemische, thermische oder ionisierende Sterilisation kann das Infektionsrisiko zwar minimiert werden, gleichzeitig mindert dies jedoch die biologischen und biomechanischen Eigenschaften der Transplantate (Skinner, 1990).

### II.3.3. Hydroxylapatitkeramiken (HA-Keramiken)

Es handelt sich um rein anorganische Knochenersatzmaterialien aus Rinderknochen, Korallen oder von synthetischer Herkunft. Abhängig von deren Herkunft und der weiteren Verarbeitung (Sinterung mit Erhitzen auf ca. 1000–1200 °C etc.) unterscheiden sie sich in ihren physiko-chemischen Eigenschaften wie mechanische Stabilität, Porengröße, Kristallitgröße, Löslichkeit, spezifische Oberfläche u. a. Durch die Keramisierung sind die Präparate bei sachgerechter Herstellung antigenfrei und ohne infektiöses Risiko. Sie kommen kompakt oder spongiös, als Formkörper, Granulat oder Pulver zur Anwendung. Ihr Calcium-Phosphat-Verhältnis nähert sich demjenigen des Knochens von 1,67.

Ihre Biokompatibilität wird in der Literatur überwiegend als gut beschrieben (Behrens et al., 2000; Cancian et al., 1999; Daculsi et al., 1988; Daculsi, Passuti et al., 1990; Guenther et al., 1998; Helber und Ulrich, 2000; Inoue et al., 1997; Mandelkow et al., 1990; Osborn, 1985; Osborn und Newesely, 1980; Stutzle et al., 1998; Yubao, Klein, Zhang et al., 1994). Dennoch beobachteten einige Arbeiten negative Gewebereaktionen wie:

- unspezifische Entzündungsreaktionen (Korkusuz und Uluoglu, 1999; Lehtinen et al., 1990),
- eine unterschiedlich stark ausgeprägte fibröse Abwehrreaktion (Butts et al., 1989; Chang, R. C. und Kao, 2000; Cullum et al., 1988; Frame et al., 1987; Klinge et al., 1992; Lehtinen et al., 1990; Liebendörfer und Tröster, 1997),
- eine eosinophile Knochenmarksdepletion und –fibrosierung (Chang, R. C. und Kao, 2000; Korkusuz und Uluoglu, 1999; Röser et al., 1994)
- sowie lokale Osteonekrosen und -resorptionen (Klinge et al., 1992; Korkusuz und Uluoglu, 1999).

Die therapeutische Wirkung von HA-Keramiken besteht vor allem in einer Osteokonduktion für das vom Implantatbett aus einwachsende fibrovaskuläre und ossäre Bindegewebe (Cornell und Lane, 1998; Kurioka et al., 1999; Nagashimi et al., 1995; Tamai et al., 2002). Vorteilhaft ist diesbezüglich ein makroporöses trabekuläres Gerüst mit gefäßdurchgängigen interkonnektierenden Fenestrationsen (Kurioka et al., 1999; Ono, Tateshita et al., 1996), wie sie lange Zeit nur bei Keramiken von natürlicher Herkunft gefunden wurden (Wahlig et al., 1991).

Eine osteoinduktive Potenz wird den Präparaten von den meisten Autoren abgesprochen (Kent et al., 1986; Mc David et al., 1979; Misch und Dietsh, 1993; Pinholt et al., 1991; Reddi et al., 1987). Einige Untersuchungen zeigten hingegen insbesondere bei makroporösen Keramiken mit rauer Oberfläche eine heterotope osteoinduktive Knochenneubildung (Gosain et al., 2002; Yuan et al., 1999).

DUAN et al. (2002) erklären dies mit postoperativ stattfindenden oberflächenabhängigen Ionenaustausch-, Lösungs- ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) und Präzipitationsprozessen, die zur Ausbildung einer biologischen Hydroxylapatitschicht führen (Radin et al., 1998). Letztere begünstigt die Adhäsion von Proteinen und Zellen („Apatit-Protein-Affinität“) und fungiert als Nukleationszentrum für nachfolgende Mineralisationsvorgänge („Epitaxie“ bzw. „struktureller Osteotropismus“) (Daculsi, 1998; Daculsi et al., 1997; Daculsi et al., 1988; Daculsi, LeGeros et al., 1990; Dielert et al., 1988; Ducheyne et al., 1992; Ducheyne und Cuckler, 1992; LeGeros, 1993; Osborn und Newesely, 1980; Richard et al., 1998; Yubao, Klein, Zhang et al., 1994).

NORDSTROM et al. (1999) sowie OHGUSHI et al. (1993) beobachteten in vitro auf Hydroxylapatit-Implantat-Oberflächen die Differenzierung mesenchymaler Stamm- und Stromazellen zu Osteoblasten.

Neu gebildeter Knochen geht mit der dynamischen Implantatoberfläche eine chemische Verbindung ein (*bone bonding*) (Tracy und Doremus, 1984), was als Osteokoaleszenz bzw. nach OSBORN (1985) als Bioaktivität bezeichnet wird (Hench et al., 1971; Hench und Wilson, 1984). Neuere Produkte weisen zusätzlich eine Oberflächenbeschichtung auf, z. B. Os Satura<sup>TM</sup> PCH<sup>®</sup> (*Porous Coated HA*), um die knöcherne Einheilung der Materialien zusätzlich zu verbessern.

Hydroxylapatitkeramiken sind im Gegensatz zu Tricalciumphosphat-(TCP-) Keramiken und nicht keramisierten Hydroxylapatitpräparaten weitestgehend resorptionsstabil (Bucholz, R. W. et al., 1988; Holmes, R. E. et al., 1987; Klein, C. P. A. T. et al., 1983; Liebendörfer und Tröster, 1997; Vuola et al., 2000). Dies ist auf kristallographische Veränderungen während des Sinterungsprozesses zurückzuführen (Yuasa et al., 2001). Hierbei konglomerieren und verschmelzen die natürlichen nadelförmigen Nanohydroxylapatitkristalle (Länge: 5-20 nm; Durchmesser: 60 nm) (Robinson und Watson, 1952) zu biphasischen hexagonalen unlöslichen Hydroxylapatittricalciumphosphat-(HA/TCP-)Partikeln von ca. 1–7 µm Durchmesser (Dielert et al., 1988; Osborn, 1985; Jarcho, 1992; LeGeros, 1993; Yubao, Klein, De Wijn et al., 1994). Als sog. dauerhafte osteoimplantäre Verbunde entziehen sie sich dem osteo-klastären Remodelling. Wie sich dies auf die Biomechanik im Implantationsgebiet auswirkt, ist bisher nur unzureichend erforscht (Guenther et al., 1998).

Inwieweit die Produkte knöcherne Heilungsprozesse in vivo beeinflussen, stellt sich in der Literatur uneinheitlich dar. In einigen Untersuchungen übten sie verglichen mit dem Leerdefekt einen förderlichen Einfluss auf die Knochenheilung aus, ohne die osteogene Potenz von auto- und allogenen Transplantaten zu erreichen (Guenther et al., 1998; Holmes, R. E. et al., 1987; Röser et al., 1994; Schnettler, 1992).

In einer tierexperimentellen Untersuchung von MITTELMEIER et al. (1998) übertraf die Knochenneubildungsrate der bovinen Keramik Pyrost<sup>®</sup> sogar diejenige des allogenen Transplantates.

MANDELKOW et al. (1990) stellten dagegen für die Präparate Bio-Oss<sup>®</sup> und Pyrost<sup>®</sup> eine im Vergleich zum Leerdefekt verzögerte knöcherne Einheilung fest.

### **II.3.3.1. Bovine Hydroxylapatitkeramiken**

Diese rein anorganischen Materialien werden aus Rinderknochen durch Pyrolyse (Wärmebehandlung >1000 °C (z. B. Pyrost®) oder ein zweizeitiges thermisches Verfahren (oxidative Verbrennung/Veraschung) hergestellt (z. B. Endobon®), wobei die organische Phase denaturiert bzw. extrahiert wird. Durch den weitgehenden Erhalt der natürlichen Spongiosa-architektur (Trabekelstärke, Porengröße und Interkonnektionen) sind diese Präparate bezüglich ihrer osteokonduktiven Eigenschaften synthetischen Keramiken überlegen (Chen et al., 1996; Rueger, 1998; Wahlig et al., 1991).

Bezüglich Resorptionsfähigkeit nimmt die ammoniakbehandelte entproteinierte Keramik Bio-Oss® eine Sonderstellung ein. BERGLUNDH und LINDHE (1997), PIATTELLI et al. (1999), TAYLOR et al. (2002) und ZITZMANN et al. (2001) schreiben dieser eine langsame osteoklastäre Resorption zu. Dagegen konnten SCHLEGEL (1996) sowie SCHLEGEL und DONATH (1998) in Untersuchungen von 126 Bio-Oss®-Implantaten (71 Patienten) auch nach sechs Jahren keine resorptiven Prozesse an knochenfreien Implantatoberflächen beobachten.

Unabhängig davon kamen JENSEN et al. (1996) zu vergleichbaren Ergebnissen. Diese beobachteten bei einer achtwöchigen Nachbeobachtungszeit beim Kaninchen keine Reduktion der Implantatmasse. Ebenso stellten SKOGLUND et al. (1997) die Resorbierbarkeit von Bio-Oss® in Frage. Eine fehlende Osteoklastenadsorption in vitro verzeichneten TAYLOR et al. (2002).

MITTELMEIER et al. (1998) belegten in einer vergleichenden tierexperimentellen Studie für Pyrost® eine schnellere und quantitativ höhere Knochenneubildung als für Endobon® und führten dies auf strukturelle Unterschiede der Spongiosa und auf die Entfernung der freien Calciumreserve bei Endobon® zurück.

### **II.3.3.2. Synthetische Hydroxylapatitkeramiken**

Diese werden in der Regel durch Präzipitation und nachfolgende Sinterung bei 1100–1200 °C hergestellt (z. B. Alveograf<sup>®</sup>, Apagran<sup>®</sup>, Calcitite<sup>®</sup>, Cerapatite<sup>®</sup>, Ceros<sup>®</sup>, Friabone<sup>®</sup>, Ossatite<sup>®</sup>, Periograf<sup>®</sup>, Synthacer<sup>®</sup>, Synatite<sup>®</sup>).

Dabei reorganisieren sich die nadelförmigen Nanokristalle, wie bereits auf Seite 29 besprochen, zu unlöslichen Mikrokristallen (1–7 µm) (Dielert et al., 1988; Osborn, 1985; Jarcho, 1992; LeGeros, 1993; Yubao, Klein, De Wijn et al., 1994). Durch die Zugabe von leicht flüchtigen Substanzen (z. B. Naphtalen) wird ein dreidimensionales Porensystem geschaffen und die osteokonduktiven Fähigkeiten verbessert (Kurioka et al., 1999).

Während ältere synthetische Keramiken durch das Fehlen interkonnektierender Fenestrationsen den natürlichen HA-Keramiken in den osteokonduktiven Fähigkeiten nachstanden (Wahlig et al., 1991), verfügen neuere Produkte über interkonnektierende Fenestrationsen, sog. *connecting channels* (Durchmesser: 40-200 µm), die das Einsprossen von Gefäßen ermöglichen (Tamai et al., 2002).

Nach KLAWITTER und HUBERT (1991) ist das Einwachsen von Bindegewebe ab einem Porendurchmesser von fünf bis 15 µm möglich. Mineralisiertes Knochengewebe kann sich in Poren von ca. 100 µm Durchmesser entwickeln, während für die Ausbildung von Osteonen Durchmesser von ca. 200 µm benötigt werden.

KURIOKA et al. (1999) berichten von Knochenbildungen in Poren unter 50 µm Durchmesser. YAMAZAKI (1984) beobachtete auch Knochenwachstum in Fenestrationsen von unter 10 µm, wenn diese Anschluss an größere Kanäle (>100 µm) hatten.

### **II.3.3.3. Koralline Hydroxylapatitkeramiken**

Korallen bestehen aus einer organischen Matrix und einem mineralischen Stützskelett (Calciumcarbonat in Form von Aragonit), was architektonisch dem humanen Spongiosagerüst stark ähnelt. Insbesondere das Stützskelett der Korallengattung *Goniopora* weist 600 µm durchmessende, parallel orientierte Poren mit Fenestrationsen von 220 bis 260 µm Durchmesser auf, welche das Einsprossen von fibrovaskulärem Gewebe und eine nachfolgende knöcherne Durchbauung begünstigen (Cornell und Lane, 1998; Holmes, R. et al., 1984).

Durch hydrothermale Konversion und Behandlung mit Ammoniumphosphat entstehen aus dem Calciumcarbonatskelett Hydroxylapatitpräparate (z. B. ProOsteon®) (Roy und Linnehan, 1974).

Die Kristalle unterscheiden durch eine geringere Kristallgröße und etwas bessere Löslichkeit. Die Präparate selbst unterliegen einer geringen osteoklastären Resorption und sind mechanisch weniger stabil (LeGeros, 1993).

Kommerziell erhältliche Knochenersatzmaterialien aus dem unveränderten korallinen Mineral Aragonit (z. B. Biocoral®) verfügen über eine höhere Resorbierbarkeit bei guter Biokompatibilität (Guillemin et al., 1989; Richard et al., 1998).

### **II.3.4. Hydroxylapatitkeramikkomposite**

Injizierbare Hydroxylapatitkeramikkomposite können beispielsweise durch die Vermengung einer granulären oder pulverförmigen Keramikkomponente mit Hydroxypropylmethylcellulose (Daculsi et al., 2000), Kollagen und Chondroitin-4-Sulfat (Flautre et al., 1996), physiologischer Kochsalzlösung (Li, T. et al., 1995) oder Gelatine (Heisel, 1987) hergestellt werden.



### II.3.5. Hydroxylapatit-Kollagen-Kombinationen

Diese nicht keramisierten Knochenersatzmaterialien sind von boviner Herkunft (z. B. Lubbock®/Laddec®, Oxbone®, Surgibone®, Tutodent® Chips/CS Block) oder sind als sog. biphasische Materialien eine Kombination aus synthetischem Hydroxylapatit und xenogenem Kollagen (Collapat®, Ossatite® Composite; mit TCP-Zusatz: Collagraft®).

Durch unterschiedliche Herstellungsverfahren werden zelluläre Bestandteile und Lipide extrahiert und Bakterien, Viren und Prionen deaktiviert. Abhängig vom Grad der Entmineralisierung unterscheiden sie sich in ihren biomechanischen und biologischen Eigenschaften (formbare Fasern, injizierbare Paste, spongiöse Formkörper mit jeweils unterschiedlichem Degradationsverhalten) (Poumarat und Squire, 1993).

Zahlreiche Untersuchungen wiesen gute osteokonduktive Eigenschaften bei guter Biokompatibilität nach (Chappard, Fressonnet et al., 1993; Chappard, Zhioua et al., 1993; Doherty et al., 1994; Morax et al., 1993; Valentini und Abensur, 1997; Valentini et al., 2000; Zhao et al., 1999). Auf Grund der erhaltenen Proteinfraction wird den Produkten außerdem eine osteoinduktive Wirkung zugesprochen (Li, X. D. und Hu, 2001). Gleichzeitig besteht damit aber auch die Gefahr einer immunogenen Entzündungsreaktion.

Diese fand sich in einer vergleichenden tierexperimentellen Untersuchungen mit Pyrost® (HA-Keramik), natürlichen Korallen, verschiedenen Xenotransplantaten (Collapat®, Surgibone®, demineralisiertes Surgibone®) und demineralisiertem Allograft alleinig für das xenogene Hydroxylapatitkollagenprodukt Surgibone® (Begley et al., 1995).

Auf Grund der fehlenden Keramisierung und einem biodegradiblen Kollagenanteil unterliegen die Produkte einer unterschiedlich ausgeprägten Resorption (creeping substitution). Für Lubbock®/Laddec® mit einem Kollagengehalt von 26% ( $\pm 1,5$ ) beobachteten CHAPPARD et al. (1993) am femorokondylären Bohrlochmodell ( $\varnothing 4,5$  mm) des Kaninchens unter Auftreten zweier Arten mehrkerniger Riesenzellen eine nahezu vollständige Resorption innerhalb von sechs Monaten.

Das Übertragungsrisiko von Krankheitserregern, insbesondere Prionen, wird bei fachgerechter Auswahl der Spendertiere und Aufbereitung als extrem gering eingeschätzt, ist aber nicht vollständig auszuschließen (Wenz et al., 2001).

### **II.3.6. Zemente**

Injizierbare und in situ aushärtende Substanzen ermöglichen eine formschlüssige Defektauffüllung und Eröffnen vielfältige mikroinvasive Therapiemöglichkeiten knöcherner Defekte. In den 60-iger Jahren kam Polymethylmethacrylat (PMMA) als erster Knochenzement zum Einsatz.

Während es in der Gelenkendoprothetik (Palacos®) und als Trägermaterial für Antibiotika (Septopal®) weiterhin zum Einsatz kommt, konnte es sich auf Grund von allergischen Reaktionen und der Behinderung einer definitiven Frakturheilung durch dessen Resorptionsstabilität als Knochenersatzmaterial nicht etablieren.

Neuere Knochenzemente zeichnen sich durch eine verbesserte Biokompatibilität und eine osteoklastäre Resorbierbarkeit aus. Die Aushärtung der Präparate gewährleistet eine Stabilisierung des Implantationsgebietes, während das osteoklastäre Remodeling osteokonduktive Strukturen für die Knochenneubildung bildet.

Die Frage einer möglichen osteoinduktiven Wirkung ist nicht abschließend geklärt. OREFFO et al. (1998) beobachteten an Calciumphosphat-Zement-Oberflächen die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten. Eine heterotope Knochenneubildung konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Auf Grund großer stofflicher Unterschiede werden im Weiteren fünf Knochenzemente einzeln vorgestellt.

### **II.3.6.1. Biobon® ( $\alpha$ -BSM®)**

Durch Vermengen einer Pulverphase mit physiologischer Kochsalzlösung entsteht eine injizierbare Paste, welche bei Körpertemperatur in einer endothermen Reaktion innerhalb von ca. 20 Minuten unter Ausbildung von nanokristallinen Calciumphosphatapatitkristallen aushärtet.

KNAACK et al. (1998) fanden nach femuraler Implantation bei Hunden bezüglich Biokompatibilität und Knochenneubildungsrate ähnliche Ergebnisse wie bei der Vergleichsgruppe mit autogenem Transplantat. Eine spezifische Entzündungsreaktion trat nicht auf. Die Knochenneubildung erfolgte als direkte Ossifikation ohne knorpelige Zwischenstufe. Durch osteoklastäres Remodeling wurde das Material innerhalb von ein bis zwei Monaten fast vollständig resorbiert.

SARKAR et al. (2001) kamen beim Menschen zu vergleichbaren Ergebnissen, beobachteten jedoch auch nach zwölfmonatiger Implantation eine nur unvollständige Resorption.

### **II.3.6.2. Cementek®**

Dieser synthetische biodegradable Hydroxylapatitzement wird durch Reaktion zwischen Tri- und Tetracalciumphosphat, Calciumhydroxid und Phosphorsäure hergestellt. Nach Vermengung einer Pulverkomponente mit einer Lösungsflüssigkeit entsteht eine modellierbare Paste, welche in situ während 15 Minuten aushärtet und dort eine osteokonduktive Wirkung entfaltet.

### **II.3.6.3. BoneSource® Classic Hydroxyapatite Cement/BVF**

Nach Vermengung einer Pulverphase (73% Tetracalciumphosphat, 27% Calciumhydrogenphosphat) mit einer Natriummonophosphatlösung entsteht eine formbare Paste, die innerhalb von fünf bis zehn Minuten aushärtet und sich nachfolgend in Hydroxylapatit umwandelt.

#### **II.3.6.4. Calcibon®**

Durch Vermengung von pulverförmigen Calcium- und Phosphatsalzen mit einer Natriumhydrogenphosphatlösung entsteht eine modellierbare Masse, die bei 37 °C in einer endothermen Reaktion aushärtet und Hydroxylapatitkristallen.

#### **II.3.6.5. Norian Skeletal-/Craniofacial Repair System (NSRS®/NCRS®)**

Durch Vermengung von Monocalciumphosphatmonohydrid (MCPM),  $\alpha$ -Tricalciumphosphat (TCP) und Calciumcarbonat sowie Zugabe von Natriumphosphatlösung bildet sich eine injizierbare Paste, die innerhalb von ca. fünf Minuten in einer gering exothermen Reaktion aushärtet. Seine Endfestigkeit erreicht das Produkt nach zwölf bis 24 Stunden. Nach zwölf Stunden besteht es zu 85–95% aus Dahllit (Carbonat-Hydroxylapatit), welches in geringer Konzentration im menschlichen Knochen vorkommt und eine geringere Kristallgröße als Hydroxylapatit aufweist.

CONSTANZ et al. (1998) untersuchten das Einwachsverhalten nach Implantation in den diaphysären Femur bei Kaninchen und stellten eine gute Verträglichkeit, ohne Entzündungs- oder Fremdkörperriesenzellen fest. Nach zwei Wochen säumten zahlreiche Osteoklasten und –blasten das Interface.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen FRANKENBURG et al. (1998), die im Hundemodell mit Nachbeobachtungszeiten bis 78 Wochen über eine fokale osteoklastäre Resorption, Neovaskularisation und die Ausbildung von Havers'schen Systemen berichten.

CLOKIE et al. (2002) stellten nach zwölfwöchiger Implantation in kranialen *Critical-Size*-Defekten bei Kaninchen histomorphometrisch nur eine geringe Knochenneubildung sowie eine Resorptionsstabilität fest. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch MORGHADAM et al. (2004), die im Kaninchenmodell nach sechs- bzw. zwölfwöchiger Implantation von Norion CRS® keine Unterstützung der knöchernen Heilung beobachteten.

Bezüglich Kompressionsfestigkeit und Biegestabilität ermittelten CONSTANZ et al. (1995, 1998) höhere Werte als für spongiösen menschlichen Knochen. Tierexperimentelle *Pull-Out*-Tests von KOPYLOV et al. (2001) wiesen der Prüfsubstanz dagegen eine geringere mechanische Stabilität als umgebendem kortikospongiösem Gewebe zu.

KOPYLOV et al. (1999) verglichen bei instabiler distaler Radiusfraktur die Therapie mit NSRS® kombiniert mit einer zweiwöchigen Cast-Stabilisierung versus einer fünföchigen Hoffmann-Bar-Behandlung (40 Patienten). Nach siebenwöchiger Nachbeobachtungszeit erzielte die erste Gruppe bessere klinische Ergebnissen. Nach drei Monaten bestanden keine funktionellen Unterschiede mehr, wobei sich in beiden Gruppen eine unzureichende Ruhigstellung mit radiologisch dokumentierter progressiver Redislokation zeigte.

### **II.3.7. Ausblick**

Über die Entwicklung von phasenreinem nanokristallinem Hydroxylapatit berichten KANO et al. (1994), LI et al. (1994), TAS et al. (2000), YUBAO et al. (1994) u. a.

Das im Handel erhältliche NanoBone® besteht aus synthetischen, ungesinterten Hydroxylapatitkristallen, die in eine Kieselgelmatrix (nanoporöses SiO<sub>2</sub>) eingelagert sind.

NELSON et al. (2006) führten Oberflächenbehandlungen von nanokristallinem und amorphem Hydroxylapatit mit einem zelladhäsivem Peptid (Lysin-Arginin-Serin-Arginin) durch. Bei Vergleich beider Substanzen mit herkömmlichem gesintertem Hydroxylapatit wies entsprechend behandelter nanokristalliner Hydroxylapatit die höchste Osteoblastenadhäsionsrate auf.

SETHURAMAN et al. (2007) charakterisierten unterschiedliche „Niedrig-Temperatur“-Calciumphosphatzemente aus nanokristallinem Hydroxylapatit anhand verschiedener biochemischer und genetischer Marker, wie die Produktion von alkalischer Phosphatase, Osteocalcin, Osteopontin, Typ-I-Kollagen sowie Osteoblasten-Genexpression in der Zellkultur.

Untersuchungen zu Zementen aus nanokristallinem Hydroxylapatit mit unterschiedlichem Calcium-Phosphat-Verhältnis und dessen Einfluss auf das Lösungsverhalten finden sich bei LILLEY et al. (2005).

WEI, G. und MA, X. P. (2004, 2006) stellten ein mit nanokristallinem Hydroxylapatit beschichtetes Polymergerüst aus Poly-L-Milchsäure (Porosität >90%) her. In vivo Untersuchungen hierzu stehen noch aus.

DU et al. (1988, 1999) führten elektronenmikroskopische und histologische Untersuchungen eines nanokristallinen Hydroxylapatit-Kollagen-Komposits, besetzt mit osteogenetischen Zellen, durch.

KIM, H. W. et al. (2007) stellten Microsphären aus Kollagen und nanokristallinem Hydroxylapatit her. Gegenüber der Kontrollgruppe (reines Kollagengerüst) beobachteten sie in vitro eine erhöhte Produktion von knochenassoziierten Genen und alkalischer Phosphatase nach Adhäsion von Knochenmarkstammzellen.

Transmissionselektronenmikroskopische und infrarotspektrographische Analysen von polyethylenglykolbeschichtetem Nanohydroxylapatit finden sich bei LI et. al. (1994). Ein injizierbares Knochenersatzmaterial aus Nanohydroxylapatit und Polyamid entwickelten WEI, S. et al. (2003) sowie ZHENG et al. (2004). Arbeiten zu Kompositen aus Nanohydroxylapatit und Polyhexamethylenadipamid führten WANG, X. et al. (2002) durch.

Oberflächenbehandlung von Calciumphosphatkeramiken führten LABELLA et al. (1994) sowie NISHIZAWA et al. (1995) durch.

## **II.4. Osteomyelitis und Ostitis**

### **II.4.1. Klassifikation, Erregerspektrum**

Das erste und bis heute gebräuchlichste Klassifikationssystem für Osteomeylitiden stellten WALDVOGEL et al. (1979) vor, welche nach ätiologischen Gesichtspunkten folgende drei Entitäten unterschieden:

- primär hämatogen,
- sekundär, als fortgeleitete Infektion und
- bei vaskulärer Insuffizienz.

Eine hämatogene Osteomyelitis tritt meist bei Kindern in den Metaphysen langer Röhrenknochen (Tibia, Femur), seltener in den Wirbelkörpern Erwachsener auf. Kausale Erreger im Neonatalalter sind meist *Staphylococcus aureus* oder Streptokokken der Gruppe B (Nelson, J., 1990). Bei Kleinkindern treten koagulasenegative Staphylokokken (*Staphylococcus epidermidis* u. a.), verschiedene Streptokokken und *Haemophilus influenzae* hinzu.

Die meisten Fälle einer vertebralen hämatogenen Osteomyelitis bei älteren Patienten sind auf gramnegative Stämme und nur selten auf *Staphylococcus aureus* zurückzuführen.

Eine Beteiligung von *Pseudomonas aeruginosa* ist bei Patienten mit intravenösem Drogenabusus zu beobachten (Waldvogel et al., 1970a, b, c, d).

Sekundäre Knocheninfektionen im Rahmen von Operationen, Frakturen oder angrenzenden Infektionen sind in ca. zwei Drittel der Fälle durch *Staphylococcus aureus* verursacht, gefolgt von *Pseudomonas* spp. (insbesondere bei plantaren Verletzungen, intravenösem Drogenabusus, Hämodialyse) und Enterobacteriaceae. Gramnegative Bakterien sind in ca. einem Drittel der Fälle die Ursache (Haas und McAndrew, 1996; Mackowiack et al., 1978; Perry et al., 1991).

Koagulasenegative Staphylokokken (insbesondere *Staphylococcus epidermidis*) sind für die Mehrheit der implantatassoziierten Osteomyelitiden und für ca. 90% der *Pin-Tract-Infections* bei externer Fixation verantwortlich (Quie und Belani, 1987; Mahan, 1991).

Bei Dekubitus, Bissverletzungen und Infektionen der Mandibula treten regelmäßig anaerobe Erreger, wie beispielsweise *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp. und *Bacteroides* spp. auf (Norden, 1985; Waldvogel et al., 1970a, b, c, d). Daneben finden sich verschiedene Streptokokken, *Propionibacterium acnes*, verschiedene Mykobakterien, Salmonellen (insbesondere bei homozygoter Sichelzellanämie) und *Neisseria gonorrhoe*.

Bei vaskulärer Insuffizienz, zum Beispiel im Rahmen einer diabetischen Mikro- und Makrovaskulopathie oder pAVK, finden sich meist aerob-anaerobe Mischkulturen mit *Staphylococcus aureus* und verschiedenen grampositiven und gramnegativen, aereoben und anaeroben Bakterien; im Einzelnen insbesondere *Staphylococcus epidermidis*, Enterokokken, Streptokokken, *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp. u. a. (Norden, 1985; Wheat et al., 1986).

## **II.4.2. Behandlungsstrategien – Einsatz von Antibiotikaträgersystemen**

Eine akute hämatogene Osteomyelitis ohne Abszessbildung kann nach NELSON (1990) und TETZLOFF et al. (1978) durch eine alleinige antimikrobielle Therapie behandelt werden. Chronische Osteomyelitiden (>6 Monate dauernd (Weiland, Moore et al., 1984)) treten meist posttraumatisch oder als Komplikation einer hämatogenen Infektion auf und erfordern in der Regel zusätzliche chirurgische Maßnahmen.

Durch eine infektionsbedingte Hyperperfusion kann es zu einer medullärer Drucksteigerung und Ausbildung von Gewebeinfarkten und Nekrosen kommen (Norden, 1985). Diese avitalen Knochensequester („Totenlade“) sind weder für die körpereigene Immunabwehr noch für systemisch applizierte Antibiotika zugänglich



und bilden vergleichbar mit synthetischen Oberflächen einen idealen Nährboden für eine bakterielle Besiedelung. Eine chirurgische Intervention mit Nekrosektomie und Debridement, Obliteration von Toträumen, Weichteildeckung und Stabilisierung sowie Entfernung von eventuell vorhandenem Fremdmaterial ist deshalb die entscheidende Therapiemaßnahme bei chronischen Osteomyelitiden.

Eine definitive Infektsanierung kann nur durch eine begleitende antimikrobielle Behandlung erreicht werden. Auf Grund der oben beschriebenen Durchblutungsstörungen und zusätzlicher bakterieller Pathomechanismen, wie die Produktion von Biofilmen (Alam et al., 1990), intrazellulärem Hiding, Selektion u. a. (Ciampolini und Harding, 2000) sind systemtherapeutisch relativ hohe Serumspiegel notwendig, um effektive ossäre Wirkstoffkonzentrationen zu erreichen.

Traditionelle Empfehlungen für eine systemische Therapie bestehen aus vier- bis sechswöchigen antibiotischen Behandlungen (Mader et al., 1996; Waldvogel et al., 1970a, b, c, d), ggf. unterstützt durch eine hyperbare Sauerstoffbehandlung zur Verbesserung der körpereigenen Abwehr (*oxidative burst* in Granulozyten) und Wachstumshemmung anaerober Bakterien.

Um die Nebenwirkungsrate bei langdauernder und hochdosierter systemischer antibiotischer Therapie zu reduzieren und die Wirkstoffspiegel in Infektionsgebiet zu erhöhen, verfolgte man schon früh das Konzept der lokalen Antibiotikaapplikation. Zunächst wurden Blut und Gips als Trägermaterialien eingesetzt. 1970 verwendeten BUCHOLZ und ENGELBRECHT den in der Hüftendoprothetik eingesetzten Knochenzement Polymethylmethacrylat (PMMA) Palacos® als Trägersubstanz für verschiedene Antibiotika und erzielten damit eine deutliche Reduktion der postoperativen Infektionsrate (Bucholz, H. W. und Engelbrecht, 1970).

Heute stellt die lokale Applikation von Antibiotika zusammen mit einer chirurgischen Herdsanierung die zentrale Behandlungsstrategie bei chronischen Knocheninfektionen dar.

### II.4.3. Biomaterialien als Antibiotikaträger in der Osteomyelitistherapie

Als Trägermaterialien stehen uns heute verschiedene biodegradable oder resorptionsstabile, natürliche oder synthetische Stoffe zur Verfügung. Um Zweiteingriffe zur Materialentfernung zu vermeiden, konzentrieren sich die Forschungsbemühungen auf die Entwicklung von resorbierbaren Wirkstoff-trägermaterialien.

Die Freisetzungskinetik der Trägersysteme ist neben dem Trägermaterial (spezifische Oberfläche, Porosität, Bindungsstellen, Resorptionsverhalten etc.) und den physiko-chemischen Eigenschaften des Antibiotikums (Löslichkeit, thermische Stabilität, Interaktion mit dem Trägermaterial etc.) nicht unerheblich von den Bedingungen im Implantationsgebiet (bindegewebige Abkapselung der Implantate (Anderson, J. M. et al., 1981), Durchblutung, pH-Wert u. a.) abhängig (Wahlig und Dingeldein, 1987). Zusammenfassend stellt dies die folgende Abbildung dar.

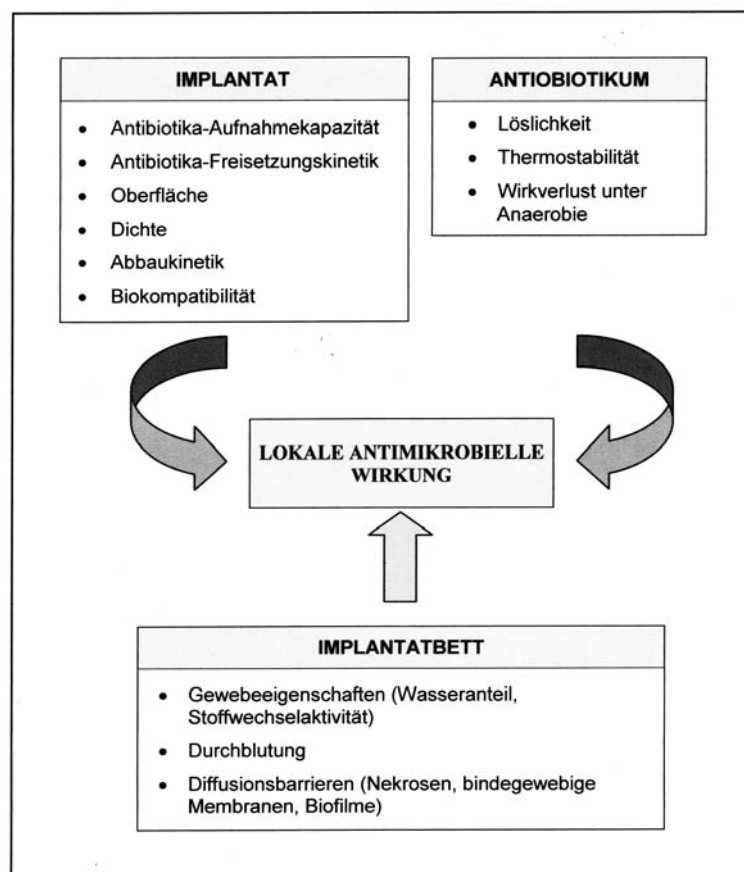


Abbildung 3: Einflussfaktoren auf die In-vivo-Pharmakokinetik von lokal applizierten Antibiotikaträgersystemen. Quelle: Eigener Entwurf.

### **II.4.3.1. Handelsübliche Präparate**

#### ***Polymethylmethacrylat***

Wie bereits beschrieben verwendeten Bucholz und Engelbrecht 1970 den in der Hüftendoprothetik eingesetzten Knochenzement Polymethylmethacrylat (Palacos®) als Trägersubstanz für verschiedene Antibiotika (Bucholz, H. W. und Engelbrecht, 1970). 1979 entwickelte Klemm Gentamycinbeladene PMMA-Kugeln und –Ketten, womit er sowohl die Freisetzungskinetik als auch die Handhabung des von Bucholz und Engelbrecht entwickelten Zementes verbesserte (Klemm, 1979a). Bis heute finden Gentamycinbeladene PMMA-Ketten (Septopal®) breite klinische Anwendung in der Prophylaxe und Behandlung von Knochen- und Weichteilinfektionen.

Die Freisetzungskinetik verläuft charakteristischer Weise exponentiell mit einem initialen, Stunden bis wenige Tage andauernden moderaten Burst (ca. 5% der Antibiotikumgesamtmenge in 24 Stunden) (Nelson, C. et al., 1994; Wahlig, 1980) und einer anschließenden, Monate bis Jahre dauernden basalen Abgabe (Adams et al., Nov 1992; Mader et al., 1997; Salvati et al., 1986; Wahlig et al., 1978b, 1979).

Zahlreiche Autoren berichten über gute klinische Ergebnisse in der Osteomyelitisstherapie mit kombinierter systemischer und lokaler (Septopal®) Antibiotikumtherapie nach vorangegangener Nekrosektomie (Calhoun et al., 1994; Fen, 1980; Vecsei und Barquet, 1981; Walenkamp und van Rens, 1982). In einer klinischen Studie mit 100 Patienten konnten WALENKAMP et al. (1998) auf eine systemische Therapie teilweise sogar verzichten.

Bezüglich der Biokompatibilität beobachteten BONK und FRIEDEN (1979) sechs Wochen postoperativ eine bindegewebige Abkapselung mit Fremdkörperriesenzellen und neutrophilen Granulozyten.

Eine perkutane oder operative Entfernung der resorptionsstabilen Ketten ist auf Grund einer möglichen bakteriellen Besiedelung und Reinfektion (Neut et al., 2001) sowie Resistenzentwicklung bei obig beschriebener langjähriger Antibiotikumfreisetzung stets anzustreben (Kendall et al., 1996; Neut et al., 2001; van

de Belt, Neut, Schenk et al., 2000; van de Belt, Neut, Uges et al., 2000; von Eiff et al., 1997). Die hierbei entstehenden Hohlräume erfordern aus biomechanischen Gründen und zum Schutz vor Reinfektionen gegebenenfalls den Einsatz von Knochentransplantaten oder –ersatzmaterialien.

## **Kollagen**

Bovines Kollagen findet nach unterschiedlichen Herstellungsverfahren (Lyophilisierung, Gammabestrahlung, Ethylenoxid-/Formalinbehandlung) als Kollagenvlies (z. B. Sulmycin® Implant-Schwamm, Gentacoll®, Lyostypt®, Hämostagen®) oder strukturiertes Kollagen mit erhaltener Spongiosaarchitektur (z. B. Osteovit®) klinische Anwendung als Antibiotkaträgermaterial.

Die Produkte zeichnen sich neben einer blutstillenden (hämostyptischen) (Beachey et al., 1979; Staniszevska-Kus, 1985; Wang, Y. S. et al., 2001) und einer wundheilungsfördernden Wirkung (Doillon, 1988; Lorenzetti et al., 1973; Nagelschmidt und Struck, 1978) vor allem durch ihre Resorbierbarkeit aus, die eine operative Entfernung überflüssig macht. Während ihr Einsatz bei Weichteilinfektionen unstrittig ist, wird die Indikation für die Therapie von Osteomyelitiden auf Grund der kürzeren Wirkstofffreisetzung im Vergleich zu PMMA-Produkten und beobachteten erhöhten Reinfektionsraten kontrovers diskutiert (Letsch et al., 1993).

Angaben über die vollständige Resorptionsdauer variieren zwischen einigen Tagen bis wenigen Wochen (Etherington et al., 1979; Quteish et al., 1990; Riegels-Nielsen et al., 1986; von Hasselbach, 1989). Eine Übertragung der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist bei ordnungsgemäßer Behandlung als extrem gering einzuschätzen, jedoch nicht völlig auszuschließen.

In-vitro-Elutionsuntersuchungen berichten übereinstimmend von initial hohen und, im Vergleich zu PMMA-Ketten, schneller abfallenden Wirkstoffspiegeln. In Untersuchungen von SORENSEN et al. (1990) setzte ein gentamycinbeladener Kollagenschwamm innerhalb von 1,5 Stunden 95% des gebundenen Wirkstoffs, im Vergleich zu 8% bei Septopal® frei.

Bei WACHOL-DREWEK et al. (1996) gaben der Kollagenschwamm Lyostypt<sup>®</sup> sowie strukturiertes Kollagen aus demineralisierter Spongiosa (Osteovit<sup>®</sup>) die Antibiotika innerhalb von ein bis zwei Tagen (Clindamycin, Vancomycin, Cefotaxim) bzw. drei bis vier Tagen (Gentamycinsulfat) vollständig ab. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen GRZYBOWSKI et al. (1997) und WERNET et al. (1992).

Für Gentamycinsulfat zeigte BECKER et al. (1994) eine wirksame Freisetzung für die Dauer von sieben Tagen, WAHLIG UND DINGELDEIN (1988) erreichten mit schwerlöslichem Gentamycinsalz eine effektive Freisetzung über zehn Tage.

Tierexperimentelle Studien kommen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen mit wirksamen lokalen Gewebekonzentrationen zwischen 18 Stunden und 28 Tagen (Humphrey et al., 1998; Riegels-Nielsen et al., 1995; Wahlig und Dingeldein, 1988).

Uneinheitlich stellt sich auch die Datenlage in klinischen Studien dar. Gute klinische Ergebnisse erzielten unabhängig voneinander IPSEN et al. (1991) und WERNET et al. (1992). VON HASSELBACH (1989) beobachtete dagegen bei 58 adjuvant behandelten Osteomyelitispatienten mit einem Gentamycinbeladenen Kollagenschwamm bei 19 Studienteilnehmern Rezidive innerhalb des ersten Jahres.

Eine erhoffte osteoinduktive Wirkung erwies sich bisher in zahlreichen Versuchen als sehr gering bzw. nicht vorhanden (Wernet et al., 1992).

### ***Calciumsulfat***

Durch Erhitzen von Gips (Calciumsulfatdihydrat) auf 120 bis 180 °C entsteht durch Reduktion des Wasseranteils der sog. gebrannte Gips, Calciumsulfathemihydrat. Bei Vermengung mit Wasser bildet sich in einer exothermen Reaktion (Temperaturen zwischen 33 und 50 °C) Calciumsulfatdihydrat mit kristalliner Struktur aus. Dieses synthetische und binnen Wochen bis Monaten vollständig resorbierbare Knochenersatzmaterial mit osteokonduktiver Wirkung (Jamali et al., 2002; Petruskevicius, 2002; Kelly, 2001) kam beim Menschen erstmals 1894 als sog. Knochenplombe zur Füllung größerer Knochendefekte zum Einsatz (Dreesmann, 1892).

Heute finden Calciumsulfathemihydratpellets (Osteoset®) und -formkörper (Cem-Ostetic®), sowie Calciumsulfat mit 5%-igem Tobramycingehalt (Osteoset-T®) klinische Anwendung.

Die Eigenschaften von Calciumsulfat hängen neben Größe, Oberfläche und chemischer Verbindung in besonderem Maße von dessen Dichte bzw. Porosität ab, welche durch den Wassergehalt der Präparate in gewissen Grenzen gesteuert werden kann. Biokompatibilität, osteogene Potenz und pharmakokinetische Eigenschaften können deshalb zwischen den verschiedenen Materialformen erheblich variieren. Entsprechend stellen sich die Untersuchungsergebnisse uneinheitlich dar.

Tierexperimentelle Studien von ELKIN und JONES (1988) und HADJIPAVLOU et al. (2000, 2001) beobachteten bei Gips eine gleichwertige Knochenneubildungsrate wie bei autogenen Knochentransplantaten. Ebenfalls gute Ergebnisse ermittelten KELLY et al. (2001), MIRZAYAN et al. (2001) und TURNER et al. (2001). PETRUSKEVICIUS et al. (2001, 2002) schrieben Osteoset® einen moderaten bzw. keinen Effekt auf die Knochenneubildung zu.

CLOKIE et al. (2002) beobachteten bei kranialen *Critical-Size*-Defekten an Kaninchen mit Calciumsulfat alleinig die Ausbildung von fibrösem Narbengewebe, während mit demineralisierter Knochenmatrix eine nahezu vollständige knöcherne Defektdurchbauung (95,5%) erreicht wurde.

Über ausgeprägte Entzündungsreaktionen in drei von 19 klinischen Anwendungen berichten ROBINSON et al. (1999). Ursächlich vermuten die Autoren die hohen Calciumkonzentrationen infolge der Implantatauflösung.

### **PerOssal®**

Hierbei handelt es sich um ein Komposit, bestehend aus dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten nanokristallinen Hydroxylapatit Ostim® und Calciumphosphat. Es weist eine spezifische Oberfläche von 106 m<sup>2</sup>/g auf und kann mit unterschiedlichen Antibiotikallösungen vermengt werden. 2003 erhielt es die Europazulassung als antibiotikumbeladenes Knochenersatzmaterial.

ENGLERT et al. (2007) wiesen für Vancomycin und Gentamycin eine Freisetzung über zehn Tage in vitro nach, die gegen die meisten kausalen Erreger von Knocheninfektionen wirksam war. RAUSCHMANN et al. (2005) verglichen PerOssal<sup>®</sup> mit reinem Calciumphosphat ebenfalls in Verbindung mit Gentamycin und Vancomycin in vitro und stellten für PerOssal<sup>®</sup> eine höhere initiale und nach fünf Tagen geringere Freisetzung fest. Nach zehn Tagen hatte es 94,7% des Gentamycins und 96,3% des Vancomycins freigesetzt.

#### **II.4.3.2. Ausblick**

##### ***Nanokristalliner Hydroxylapatit***

KANO et al. (1994) berichten über aminoglykosidbeladenen, nanokristallinen Hydroxylapatit (40x15x10 nm) mit einer spezifischen Oberfläche von 100 m<sup>2</sup>/g und einer Aminoglykosidadsorption von 0,2 mg/mg.

ZOU et al. (2009) untersuchen ein Knochenzement aus nanokristallinem Hydroxylapatit und Chitosan sowie Berberin als antibiotisch wirksame Substanz.

##### ***Biodegradable synthetische Polymere***

Die bekanntesten Verbindungen dieser Gruppe sind Polylaktatpolyglykolverbindungen und polymerisiertes Dilaktat. Neuere Arbeiten untersuchten Polyhydroxybutyratcohydroxyvalerat (Yagmurlu et al., 1999), Polydimethylsiloxan (PDMS) (Dash und Suryanarayanan, 1992), Fettsäuredimersebacinsäure (Nelson, C. L. et al., 1997), Polyanhydridpolymere (Laurencin et al., 1993) und Aminopolysaccharide (Aimin et al., 1999).

Auf Grund großer stofflicher Unterschiede variiert die Dauer der tierexperimentell ermittelten wirksamen Gewebekonzentrationen zwischen fünf und 350 Tagen (s. a. Tabelle 10; Seite 206).

Von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist dabei die histologische Reaktion des Implantatbettes, welche im Falle einer bindegewebigen Abkapselung zu einer verzögerten Abgabe der Wirkstoffe an die Umgebung führen kann. Eine bindegewebige Umscheidung ist für Siliconelastomer- (Anderson, J. M. et al., 1981) und Polymilchsäurepräparate (Schmidt et al., 1995) sowie Milchsäureoligomer plus Dideoxykanamycin (Wei, G. et al., 1991) beschrieben.

### ***Antibiotikabeladene Hydroxylapatitkeramiken***

Experimentelle Arbeiten zu antibiotikabeladenen Hydroxylapatitkeramiken finden sich unter anderem bei KORKUSUZ et al. (1993) sowie SHIRTLIFF et al. (2002).

### ***Knochentransplantate***

In-vitro-Untersuchungen von WINKLER et al. (2000) zur Pharmakokinetik von humanen und bovinen antibiotikabeladenen Knochentransplantaten legen für Vancomycin und Tobramycin ausreichend hohe und lange Wirkstoffspiegel für die Behandlung von ossären Infektionen dar. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen HERNIGLU et al. (1991) und McLAREN&MINIACI (1986).

Dagegen bestimmten MICLAU et al. (1993) die In-vitro-Freisetzungskinetik tobramycinbeladener Knochentransplantate bzw. PMMA-Kugeln mit 24-Stunden-Abgaberraten von 70% bzw. 6,7% und hielten eine prolongiertere Freisetzung bei Knochentransplantaten für wünschenswert.

Für Gentamycinbeladene Xenotransplantate ermittelten LI und HU (2001) tierexperimentell wirksame Gewebekonzentration für mindestens zehn Tage. SEBER et al. (1998) erzielten hiermit in einer klinischen Studie ebenfalls gute Erfolge.

Darüber hinaus finden sich zahlreiche Arbeiten über verschiedenste Komposite, insbesondere mit Hydroxylapatit, sowie die Entwicklung von antibiotikumbeladenen Mikrosphären, deren Auflistung und Abhandlung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde.



### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **III.1. Versuchstiere**

Der tierexperimentelle Versuchsteil wurde durch die zertifizierte Firma Coripharm, Dieburg, nach den Richtlinien der ISO Norm 10993 geplant und unter der laufenden Nummer 14-53/00 beim Thüringer Landesverwaltungsamt registriert.

Die Unterbringung von 26 weiblichen Weißen Neuseeländerkaninchen (Alter: 9-12 Monate, OP-Gewicht: 3124,42 g; SD: 266,01 g; Kleintierzucht Ronald Krieg, 06255 Niederwünsch) erfolgte eine Woche präoperativ in ca. 1 m<sup>2</sup> großen Holzspaneinstreulaufställen in Zweiergruppen. Kaninchentrockenmischfutter (Ringkanin; Universal-Alleinfuttermittel; Fa. Raiffeisen), Heu und Wasser standen über den gesamten Versuchszeitraum ad libitum zur Verfügung. Durch die Zugabe von Toltrazuril zum Trinkwasser (20 mg/kg KG; Baycox<sup>®</sup>; Fa. Bayer) fand eine prophylaktische Behandlung gegen Kokzidien statt. Eine fortlaufende Nummerierung ermöglichte die zufällige Gruppenauswahl.

#### **III.2. Ostim<sup>®</sup>**

Ostim<sup>®</sup> ist nanokristalliner, phasenreiner Hydroxylapatit in wässriger Suspension und kommt als 35%-ige injizierbare, sterile Paste zur Anwendung. Es ist seit Februar 2002 als Medizinprodukt der Klasse III nach der EG-Richtlinie über Medizinprodukte 93/42/EWG, Anhang II, inklusiv der DIN EN 46001:1996 für den gesamten Europäischen Wirtschaftsraum zugelassen und wird in der chirurgischer Traumatologie, Orthopädie, Kieferchirurgie und Zahnheilkunde angewendet. Die nadelförmigen Kristalle sind ca. 100 nm lang, 20 nm breit und ca. 3 nm hoch, weisen ein Ca<sup>2+</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-Verhältnis von 1,67 (1,62-1,73) auf und ähneln damit den natürlichen Hydroxylapatitkristallen des menschlichen Knochens (Osborn, 1985; Robinson und Watson, 1952; Santos et al., 1992).

Durch den feinkristallinen Charakter besitzt Ostim<sup>®</sup> eine spezifische Oberfläche von 106 m<sup>2</sup>/g (nach BET (Brunauer-Emmett-Teller-Isotherme)) (Dreher, 2001). Zum Vergleich verfügen Hydroxylapatitkeramiken über spezifische Oberflächen zwischen 0,1 m<sup>2</sup>/g (Joschek et al., 2000) und 0,04-0,07 m<sup>2</sup>/g (Kurioka et al., 1999).

Ostim<sup>®</sup> ist gut löslich (Löslichkeitspotential: 2,6 mg HA/100 g H<sub>2</sub>O). Suspendiert in entionisiertem Wasser gibt es insbesondere Ca<sup>2+</sup>- und PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-Ionen ab. Die Sterilisation des Präparates erfolgt durch Gammabestrahlung.

Im Einzelnen wurden folgende Materialien getestet:

*Tabelle 1: Implantationsmaterialien*

Ostim <sup>®</sup> -Paste	Nachfolgend bezeichnet als:	Anteil Hydroxylapatit	Anteil Clindamycinhydrochlorid	Anteil VE-Wasser
Ostim <sup>®</sup> 35	Ostim <sup>®</sup>	35%	-	65%
Ostim <sup>®</sup> 35 mit 10%-iger Clindamycinaktivität:	Ostim <sup>®</sup> plus 10	35%	11,4%	53,6%
Ostim <sup>®</sup> 35 mit 20%-iger Clindamycinaktivität	Ostim <sup>®</sup> plus 20	35%	22,7%	42,3%
Ostim <sup>®</sup> 35 mit 25%-iger Clindamycinaktivität	Ostim <sup>®</sup> plus 25	35%	28,4%	36,6%

### **III.3. Clindamycin**

Clindamycin ist ein Antibiotikum, das auf Grund seiner guten Wirkung gegen osteomyelitisrelevante Erreger (Staphylococcus aureus, verschiedene Streptokokken, Enterokokken, Enterobacteriaceae, Anaerobier u. a.) in Verbindung mit einer guten bis sehr guten Knochengängigkeit eine bedeutende Rolle in der Behandlung von Osteomyelitis erlangt hat (Feigin et al., 1971; Kaplan et al., 1982; Mader et al., 1999; Schneider und Visconti, 1977). Weitere Indikationsgebiete stellen Infektionen durch Anaerobier und aerob-anaerobe Mischfloren dar (Dhawan und Thadepalli, 1982).

### **III.3.1. Herkunft, Struktur und physiko-chemische Eigenschaften**

Clindamycin bildet zusammen mit Lincomycin die Gruppe der Lincosamidantibiotika, (Naumann, 1985). Letzteres entstand 1962 durch Isolation aus dem Kulturfiltrat von *Streptomyces lincolnensis*. Durch Austausch einer Hydroxylgruppe gegen ein Chloratom gelang es, die Verträglichkeit und die antibakterielle Wirksamkeit zu verbessern. Es entstand Clindamycin (7-Chlor-7-Desoxylincomycin), das seit 1968 in Deutschland im Handel ist (Magerlein et al., 1966). Die Wirkform stellt die freie, gut wasserlösliche Base dar. Im pH-Bereich von 2-9 ist diese in wässriger Lösung stabil.

### **III.3.2. Wirkmechanismen**

Clindamycin bindet reversibel an die 50S-Untereinheiten der 70S-Bakterienribosomen und blockiert die Peptidyltransferase (Chang, F. N. et al., 1966; Griffith L. J., 1965; Naumann, 1985). Die Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese führt zu einer Bakteriostase.

Aus systemtherapeutischer Sichtweise unterscheidet CRAIG (1993, 1998, 2001) zwischen konzentrationsabhängig wirkenden Antibiotika (Aminoglykoside, Fluoroquinolone) und zeitabhängig wirkenden Substanzen (Clindamycin, Penicilline, Cephalosporine, Aztreonam, Carbapenem, Makrolide). Während eine Maximierung der Wirkstoffspiegel in der ersten Gruppe mit einer erhöhten Bakterizidie einhergeht, führte dies bei der zweiten Gruppe zu keiner oder einer nur geringen Wirkungsverstärkung.

In weitestgehender Übereinstimmung mit CRAIG, W. A. (1998) erweiterte LEVISON (2000) diese Einteilung um eine Gruppe von Antibiotika mit „vorwiegend bakteriostatischer Wirkung“, in die er, neben Makroliden und Tetracyklinen, Clindamycin einordnete.

Zahlreiche Untersuchungen wiesen für Clindamycin eine bakterizide Wirkung in systemtherapeutisch erreichbaren Konzentrationen nach.

Durch deletäre Stoffwechseldefekte wirkt es hier bakterizid gegen:

- Oxacillinsensible und –resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (Lemmen et al., 1993)
- schleimproduzierende und nicht schleimproduzierende *Staphylococcus epidermidis* Stämme (Lemmen et al., 1993; Dingeldein, 1987)
- *Streptococcus pneumoniae* (Klepser et al., 1997)
- *Streptococcus pyogenes* (Dan et al., 1997)
- *Bacteroides fragilis* (Klepser et al., 1997; Kowalsky et al., 1990)
- *Clostridium perfringens* (Baxter et al., 1990; Pharmacia&Upjohn, 1996; Traub, 1990; Dingeldein, 1987)

Im subinhibitorischen Bereich verfügt es unabhängig von einer Reduktion der Bakterienzahl über folgende Wirkmechanismen:

- Reduktion der Glykokalyxproduktion von *Staphylococcus aureus* (Mayberry-Carson et al., 1986), *Staphylococcus epidermidis* (Gismondo et al., 1990), *Streptococcus viridans* (Dall et al., 1990), *Pseudomonas aeruginosa* (Ichimiya et al., 1994) und *Bacteroides* spp. (Veringa et al., 1989).
- Adhäsionshemmung von *Staphylococcus aureus* an Knochenoberflächen (Doran und Rissing, 1983; Mayberry-Carson et al., 1986) sowie bei *Staphylococcus epidermidis* an künstlichen Oberflächen (Khardori et al., 1991).
- Minimierung bakterieller Toxinproduktion bei:
  - *Staphylococcus aureus*: Alpha Toxin (Ohlsen et al., 1998), *Exfoliative*- (Shibl, 1981) und *Toxic-Shock-Syndrom-Toxin* (van Langevelde et al., 1997)
  - *Escherichia coli*: *Shiga-like Toxin* (Murakami et al., 2000)
  - *Clostridium perfringens*: Alpha Toxin (Stevens et al., 1987)

Die Einflussnahme auf das körpereigene Immunsystem stellt sich in der Literatur strittig dar. Zahlreiche Untersuchungen zeigen eine Beschleunigung der PMNL- (*Polymorph-Nuclear-Leucozytes*-)vermittelten Phagozytose in vitro und in vivo

(Skoutelis et al., 1993); des Weiteren eine Potenzierung der komplement- und PMNL-abhängigen Opsonisierung von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *Bacteroides* spp. (Faden et al., 1983; Gemmell, 1984; Mascellino et al., 1989; Milatovic et al., 1983; Veringa et al., 1989).

NOESS et al. (1989) konnten dagegen keinen förderlichen Einfluss auf die Phagozytose feststellen. SANTOS et al. (1992) und SCEVOLA et al. (1986) berichten von einer Verbesserung der Leukotaxis in Konzentrationen zwischen 1 und 5 µg/ml und einer Hemmung derselbigen bei 10 µg/ml.

Die Wirkung gegen intraphagosomale Erreger stuften zahlreiche Autoren als bakterizid (Astry et al., 1987; Burgaleta et al., 1992; Jacobs und Wilson, 1983; Klempner und Styrt, 1981; Saito et al., 1985), andere als bakteriostatisch (Anderson, R. et al., 1986), inaktiv (Hand und King-Thompson, 1986; Yancey et al., 1991) bzw. zellytisch (Easmon und Crane, 1984) ein.

### **III.3.3. Wirkungsspektrum**

Erreger gelten gegenüber einem bestimmten Antibiotikum als resistent, wenn die zur Wachstumshemmung oder Abtötung notwendige Wirkstoffkonzentration höher ist als die in vivo realisierbare (DIN 58940). Unter systemtherapeutischen Bedingungen liegt diese Resistenzgrenze für Clindamycin bei 4 µg/ml. Bisherige Wirkspektren basierten auf einer systemischen Wirkstoffgabe. Bei lokaler Applikation von Antibiotika können jedoch sehr viel höhere Gewebekonzentrationen im Infektionsgebiet erzielt werden, sodass sich das Keimspektrum der jeweiligen Stoffe deutlich erweitert (s. a. Ergebnisse - „Lokale Clindamycinkonzentrationen“, Seite 129 und Diskussion - „Clindamycingewebekonzentrationen“, Seite 157)

In der nachfolgenden Tabelle sind die minimalen Hemmstoffkonzentrationen sowie die minimalen bakteriziden Konzentration von Clindamycin für die wichtigsten Erreger aufgeführt. In Zusammenschau mit den erzielten lokalen Wirkstoffkonzentrationen ergibt sich hieraus das Wirkungsspektrum von Implantationssystemen.

Tabelle 2: Antibakterielle Wirksamkeit von Clindamycin. Minimale Hemm- und –bakterizide Konzentrationen (MHK/MBK) für planktonisch vorliegende Erreger.

Mikroorganismus	Empfindlichkeit (µg/ml)	
	MHK	MBK
Grampositive Aerobier und fakultative Anaerobier		
Methicillinsensible Staphylococcus aureus (MSSA) (Dan et al., 1997; Klepser et al., 1997; Lemmen et al., 1993; Xue et al., 1996)	0,04-0,4 (LeFrock et al., 1982)  0,06 (Korn und Shah, 2002; Lemmen et al., 1993)	0,125/0,2 (Mader et al., 1989) 0,25 (Klepser et al., 1997) 0,06-4 (Müller, R. et al., 1996) 3,1 (Dingeldein, 1987) (50–100) (Hand und King-Thompson, 1986)
Methicillinresistente Staphylococcus aureus (MRSA) (Lemmen et al., 1993)	32/>32 (Korn und Shah, 2002; Lemmen et al., 1993)	
α-hämolysierende Streptokokken (Müller, R. et al., 1996)	0,0075–0,06	0,0075–0,06
β-hämolysierende Streptokokken (Müller, R. et al., 1996)	0,0075-0,25	0,015-0,5
Streptococcus pyogenes	0,02 (LeFrock et al., 1982) 0,031-0,06 (Dan et al., 1997)	0,015-0,5 (Müller, R. et al., 1996)
Streptococcus pneumoniae	0,01-0,06 (LeFrock et al., 1982) 0,125 (Klepser et al., 1997; Müller, R. et al., 1996)	0,015-0,125 (Klepser et al., 1997; Müller, R. et al., 1996)
Streptococcus viridans	0,01-0,06 (LeFrock et al., 1982)	
Corynebacterium diphtheriae (LeFrock et al., 1982)	<0,2	
Grampositive Anaerobier		
Actinomyces spp. (LeFrock et al., 1982)	0,03-0,25	
Propionibacterium spp.	0,015 (Müller, R. et al., 1996) ≥0,1-0,2 (LeFrock et al., 1982)	0,06 (Müller, R. et al., 1996)

Mikroorganismus	Empfindlichkeit (µg/ml)	
	MHK	MBK
Gramnegative Aerobier und fakultative Anaerobier		
Koagulasenegative Staphylokokken (Dingeldein, 1987)	0,25	3,7
Staphylococcus epidermidis	0,125 (LeFrock et al., 1982) 512 (Korn und Shah, 1999)	0,25 (Müller, R. et al., 1996)
Streptokokken Gruppe D (Enterococcus spp.) (Dingeldein, 1987)	128	>256
Pseudomonas aeruginosa	25 - >100 (LeFrock et al., 1982) 800 (Ichimiya et al., 1994)	
Haemophilus influenzae (LeFrock et al., 1982)	0,12-50	
Escherichia, Klebsiella, Enterobacter (LeFrock et al., 1982)	25- >100	
Escherichia coli (hämolyisierende Variante) (Müller, R. et al., 1996)	64	
Serratia, Proteus (LeFrock et al., 1982)	25- >100	
Salmonella spp. (LeFrock et al., 1982)	12-25	
Neisseria gonorrhoeae (LeFrock et al., 1982)	0,01-6,3	
Neisseria meningitidis (LeFrock et al., 1982)	5-25	
Shigella spp. (LeFrock et al., 1982)	25	
Gramnegative Anaerobier		
Bacteroides fragilis-Gruppe (Klepser et al., 1997; Kowalsky et al., 1990; Spangler et al., 1997)	≥0,1-3,1 / 0,5 (Klepser et al., 1997)	0,5 / 1 (Klepser et al., 1997; Kowalsky et al., 1990)
Bacteroides melaninogenicus	≥0,1-0,2 (LeFrock et al., 1982)	0,0075-2 (Müller, R. et al., 1996)
Bacteroides thetaiotaomicron (Kowalsky et al., 1990)	0,5 (Spangler et al., 1997)-2	4 (Kowalsky et al., 1990)
Fusobacterium nucleatum (Spangler et al., 1997)	0,12	0,25

Mikroorganismus	Empfindlichkeit (µg/ml)	
	MHK	MBK
Anaerobe sporenbildende Bakterien		
Clostridium perfringens	≥0,1-3,1 (Traub, 1990) 0,07 (Stevens et al., 1987)	0,07 (Stevens et al., 1987)
Clostridium difficile (Spangler et al., 1997)	16	16
Anaerobe Kokken		
Peptococcus spp. (LeFrock et al., 1982)	≥0,1-3,1	
Peptostreptococcus spp.	≥0,1-0,5 (LeFrock et al., 1982)	0,125-1 (Müller, R. et al., 1996)
Veillonella spp.	≥0,1 (LeFrock et al., 1982)	0,06 (Müller, R. et al., 1996)
Chlamydien und Mycoplasmen (Harrison et al., 1984)		
Chlamydia trachomatis	0,25-2	4-128
Mycoplasma hominis	0,06-0,25	
Ureaplasma urealyticum	1,0-32	

### **III.3.3.1. Empfindliche Erreger**

Clindamycin ist bei systemischer Applikation wirksam gegen grampositive Aerobierstämme wie Staphylokokken (Dan et al., 1997; Klepser et al., 1997; Lemmen et al., 1993; Xue et al., 1996; Dingeldein, 1987), einschließlich einigen oxacillin- und vancomycinresistenten Staphylococcus aureus-Stämmen (MRSA) (Frank et al., 1999; Lemmen et al., 1993; Smith et al., 1988), Pneumokokken (Klepser et al., 1997) und Streptokokken (Dan et al., 1997). Empfindlich sind außerdem zahlreiche grampositive Anaerobier, wie Peptococcus und Peptostreptococcus spp., Propionibakterien und Actinomyceten. Aus der Gruppe der gramnegativen Anaerobier sind Fusobakterien und Veillonellen empfindlich, Bacteroidaceae sind mäßig empfindlich bis resistent. Ebenfalls sensibel sind Mycoplasma hominis, Chlamydia trachomatis (Harrison et al., 1984) und Plasmodien.



### **III.3.3.2. Resistenzen**

Resistenzen gegen Clindamycin entstehen durch chromosomale Mutation (Semel et al., 1980) und Plasmidtransfer (Schaberg et al., 1982; Tally et al., 1979). Durch Methylierung der Antibiotikumbindungsstellen (Adeninbasen in der bakteriellen rRNA) vermindert sich die Affinität der Bakterien für die Lincomycine (Naumann, 1985). Eine enzymatische Inaktivierung von Clindamycin ist äußerst selten (Pharmacia&Upjohn, 1996).

Zwischen Makroliden und Lincosaminen besteht eine inkomplette Kreuzresistenz (Makrolid-Lincosamin-Streptogramin-(MLS-)Resistenz) (Borges et al., 1975), weil deren Bindungsstellen auf Bakterienribosomen eng benachbart liegen und funktionell miteinander interagieren (Naumann, 1985).

Unter systemischer Therapie ist Clindamycin unwirksam gegen gramnegative Aerobier, wie *Escherichia coli*, *Klebsiella* sowie die meisten Stämme von *Proteus*, *Enterobacter*, *Salmonellen*, *Shigellen*, *Serratia* und *Pseudomonas*. *Neisseria gonorrhoeae* ist nur mäßig empfindlich. Resistent sind verschiedene Clostridien (*Cl. ramosum*, *Cl. novyi*, *Cl. sordelli*, *Cl. bifermentans*, *Cl. sporogenes* und *Cl. difficile*). Von den Mycoplasmen ist *Mycoplasma hominis* empfindlich, *Mycoplasma pneumoniae* nicht. Wie bereits im Kapitel „Wirkungsspektrum“ (Seite 53) erwähnt, gelten diese Resistenzen nicht für die lokale Wirkstoffapplikation (s. a. Diskussion – „Clindamycingewebekonzentrationen“, Seite 157).

### **III.3.4. Pharmakokinetik**

Die Serum-Eliminationshalbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) beträgt ca. drei Stunden bei Erwachsenen und ca. zwei Stunden bei Kindern. Es findet kein nennenswerter *First-pass*-Metabolismus oder enterohepatischer Kreislauf statt. Die Proteinbindung liegt zwischen 60 und 94%.

Die Knochengängigkeit klassifizieren die meisten Autoren als gut bis sehr gut (Mader et al., 1989; Müller, S. C. et al., 1999; Nicholas, P. et al., 1975; Schurman et al., 1975; Stürmer et al., 1981; Summersgill et al., 1982); allein BOSELLI und ALLAOUCHICHE (1999) stufen diese als moderat ein.

Die Knochen-Serum-Ratio liegt beim Gesunden zwischen 0,31 (Budsberg et al., 1991) und 0,4 (Mader et al., 1989; Nicholas, P. et al., 1975). In infiziertem Knochengewebe beträgt sie 0,98 (Mader et al., 1989). Die erhöhte Anreicherung an Infektionsorten erklärt sich durch eine aktive lysosomale Anreicherung in polymorphkerniger Leukozyten und Makrophagen (Easmon und Crane, 1984; Johnson et al., 1980; Klempner und Styrt, 1981; Prokesch und Hand, 1982; Stürmer et al., 1981; Waldvogel, 1985).

### **III.3.5. Metabolisierung und Ausscheidung**

Clindamycin wird zu ca. 10-30% unverändert ausgeschieden, 70-90% unterliegen einer hepatogenen Metabolisierung zu 5-Hydroxycyclindamycin (Restaktivität 13%) und 5-Oxocyclindamycin (Restaktivität 0,2%) mit biliärer Exkretion. Ca. ein Drittel scheidet der Körper renal, überwiegend in Form von Clindamycinsulfoxid (Restaktivität 15%) aus. Bei mittlerer bis schwerer Leberinsuffizienz kommt es zu einer geringen Verlängerung der Plasmaeliminationshalbwertszeit (Hinthorn et al., 1976).

### **III.3.6. Unerwünschte Wirkungen**

Die folgenden Betrachtungen beziehen sich auf die systemtherapeutische Anwendung. Bei lokaler Wirkstoffapplikation treten in der Regel niedrigere Serumspiegel auf, sodass systemische Nebenwirkungen seltener und mit milderer Ausprägung zu erwarten sind.

Überempfindlichkeitsreaktionen treten in Form von Fieber, Pruritus, morbilliformem Exanthem und sehr selten als Stevens-Johnson-Syndrom auf. Patienten mit Penicillinallergie können auch bei Clindamycin sensibel reagieren. Antibiotikumassoziierte Diarrhoen kommen bei 3,4% (Friedman et al., 1976) bis 21% (Tedesco et al., 1974) der Patienten vor. Bei längeren Therapiezeiten sind Blutbildveränderungen (Thrombozytopenie, Leukopenie u. a.) sowie ein Anstieg von Leberenzymen und Bilirubinwerten möglich.

Durch die Beeinflussung der neuromuskulären Übertragung kann sich bei entsprechenden Vorerkrankungen, wie beispielsweise Myasthenia gravis, Morbus Parkinson und ähnlichen die Symptomatik verschlechtern.

In der Schwangerschaft und während der Stillzeit sollte der Einsatz auf Grund einer stattfindenden Plazentapassage und eines Übertritts in die Muttermilch ausbleiben.

### **III.4. Versuchsaufbau**

Die histologische Beurteilung von Ostim<sup>®</sup> erfolgte nach zwei- bzw. vierwöchiger femuraler Implantation beim Kaninchen an ca. 20-70 µm dünnen Trenn-Dünnschliffen. Zur Beurteilung der knöchernen Heilungsdynamik fand eine intravitale polychrome Fluorochromfärbung mit Calceingrün und Alizarinkomplexon statt.

Der pharmakokinetische Untersuchungsteil beinhaltete die Messung lokaler Wirkstoffgewebekonzentrationen, postoperativer Serumspiegel und der Freisetzungskinetik in vitro.

Die Zuteilung der Tiere in die Gruppen erfolgte rein zufällig. Bei den Tieren aus den clindamycinhaltigen Gruppen 3 und 4 wurde auf Grund des schlechten postoperativen Allgemeinzustandes auf eine Fluorochrommarkierung ganz bzw. teilweise verzichtet (s. a. Ergebnisse - „Klinische Befunde“, Seite 78 und Diskussion - „Tier- und Operationsmodell“, Seite 133).

*Tabelle 3: Versuchsaufbau der tierexperimentellen Untersuchungen.*

Gruppe	Tierzahl	Tierzahl x Clindamycinaktivität im Implantat	Zeitpunkt der Fluorochrommarkierung mit Alizarinkomplexon (A)/ Calceingrün (C) (Tag postoperativ)				Nachbeobachtungszeit (Tage)	Untersuchungen (Tierzahl)		
			7.	10.	21.	26.		Pharmakokinetik	Fluoreszenzmikroskopie	Hellfeldmikroskopie
1	4	-	C	C	-	-	14	-	4	4
2	4	-	C	C	A	A	28	-	4	4
3	9	5x10% 4x20%	-	-	-	-	14	9	-	5
4	9	5x10% 4x20%	C	-	A	A	28	9	5	5

### **III.5. Operationsvorbereitungen und Anästhesie**

Nach Prämedikation mit Atropin (0,1 mg/kg KG i. m. 10 Minuten vor Narkoseeinleitung) zur Antagonisierung der atem- und kreislaufdepressiven Narkotikanebenwirkung erfolgte die intramuskuläre Gabe von Ketamin (35 mg/kg KG; Hostaket®; Hoechst Roussel Vet) und Xylazin 2% (5 mg/kg KG; Rompun®; Sanofi Ceva GmbH).

### **III.6. Operationsmodell**

Die Operationen verliefen unter sterilen Kautelen. Nach Rasur und Hautdesinfektion der Regio genu der rechten Hintergliedmaße mit Povidoniod (Braunol® 2000 Lösung, B. Melsungen AG) erfolgte ein ca. 3,5 cm langer longitudinaler Hautschnitt 1,5 cm lateral der Mediopatellarlinie und die Darstellung der Kniegelenkkapsel durch stumpfe Präparation. Nach Eröffnung des Kniegelenks wurde die Patella nach lateral luxiert und so das femoropatellare Gleitlager freigelegt. Unter Flexion im Kniegelenk (ca. 90°) wurde mit einer innengekühlten Diamanthohlfräse (*Diamond Bone Cutting System* - DBCS); Fa. Merck; Außendurchmesser: 4,5 mm) vom Zentrum des femoropatellaren Gleitlagers aus der Femurmarkraum eröffnet.

Nach Spülung des Markraumes mit ca. 10 ml physiologischer Kochsalzlösung wurden der diaphysäre Markraum und der Defektkanal durch Injektion von ca. 1 g der jeweiligen Prüfschubstanz aufgefüllt. Der Knorpel-Knochen-Zylinder aus der Hohlfräse diente nach Kürzung mit dem Skalpell (Länge: ca. 5 mm) dem Verschluss des Implantationskanals. Auf Grund der Substanzverluste der Fräse resultierte zwischen dem Knorpel-Knochen-Deckel und dem umgebenden Knochenlager ein ca. 400 µm messender Spaltraum.

Nachfolgend wurde das Kniegelenk extendiert, die Patella reponiert und die Gelenkkapsel (PDS 3-0; Fa. Ethicon) sowie die Cutis (Vicryl 2-0; Fa. Ethicon) mit Einzelknopfnähten verschlossen. Die Wundversorgung fand mit Aluderm-Sprühpflaster (Alvetra GmbH) statt. Alle Operationen verliefen komplikationslos und dauerten jeweils ca. 20 Minuten.

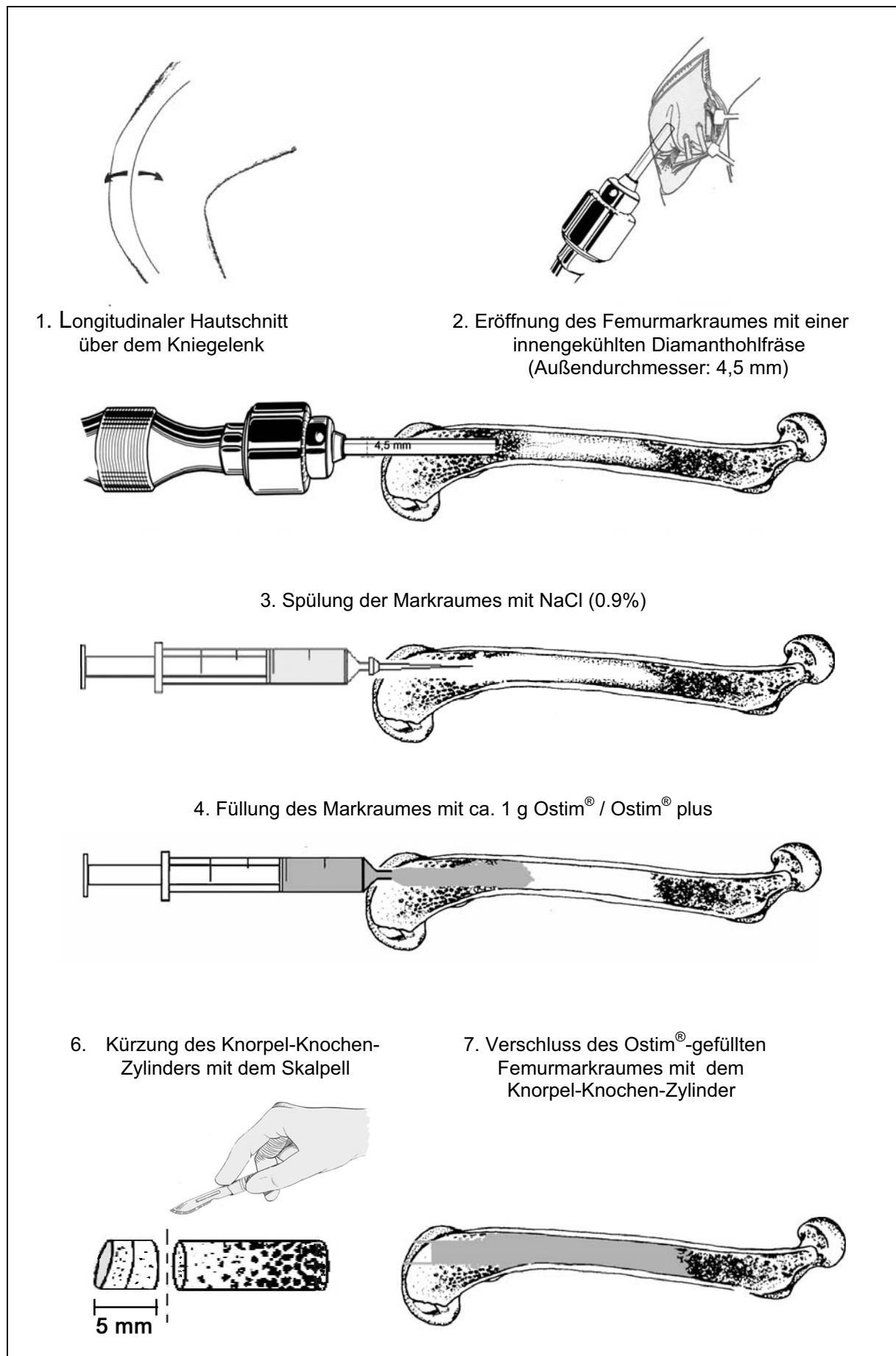


Abbildung 4: Operationsmodell

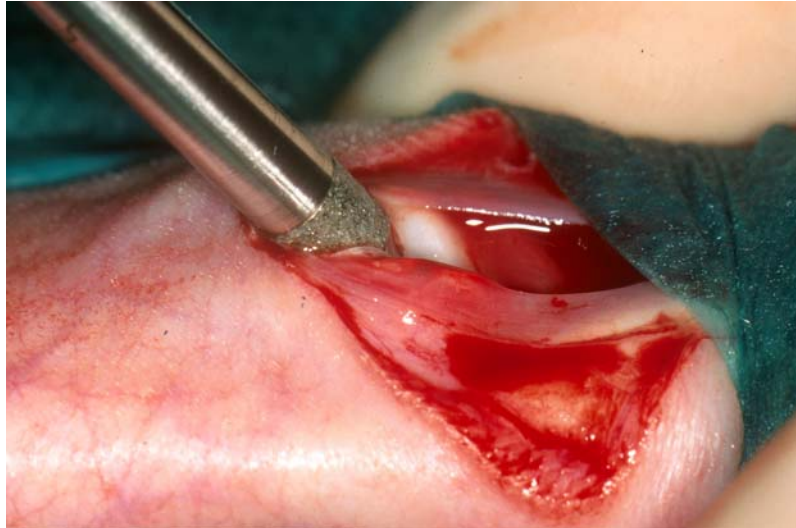


Abbildung 5: Eröffnung des femuralen Markraumes vom Patellagleitlager aus mit dem Diamond Bone Cutting System.

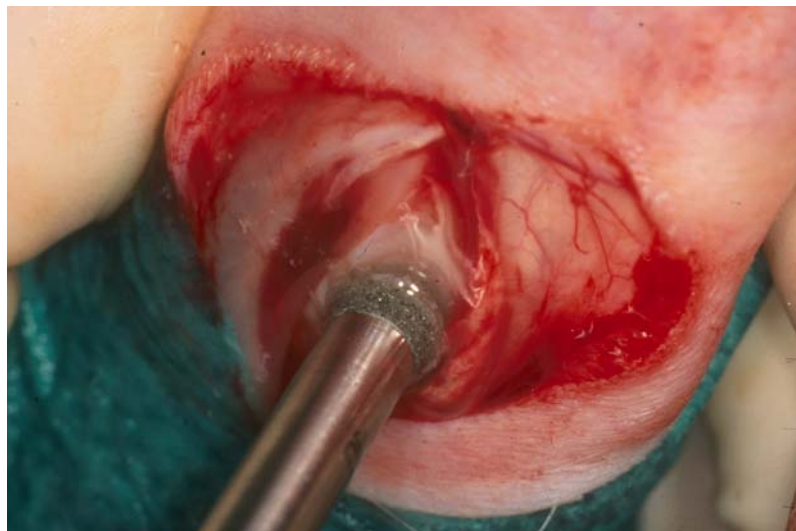


Abbildung 6: Eröffnung des femuralen Markraumes vom Patellagleitlager aus mit dem Diamond Bone Cutting System.



Abbildung 7: Entfernter Knorpel-Knochen-Zylinders aus der Diamanthohlfräse.

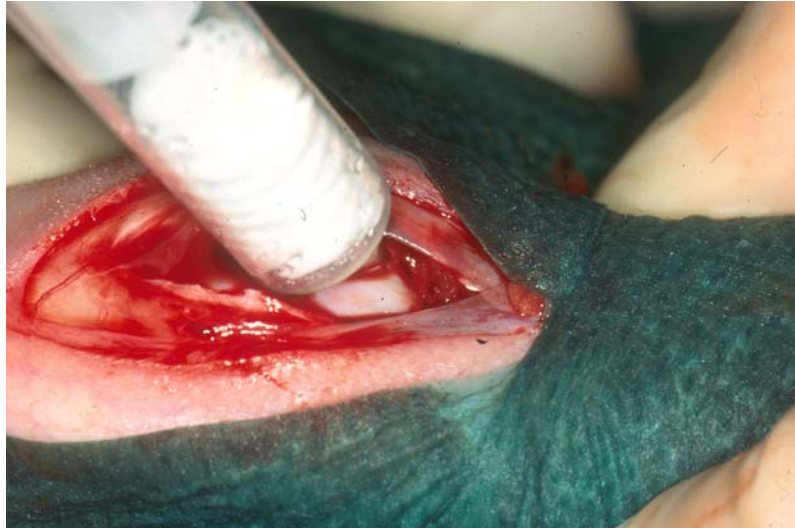


Abbildung 8: Füllung der Femurmarkraumes mit Ostim® mittels Injektion.

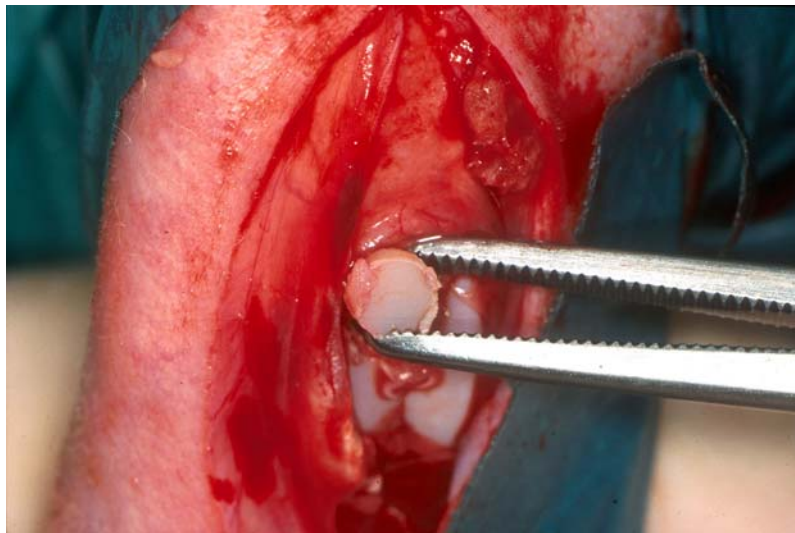


Abbildung 9: Verschluss des Implantationskanals durch Replantation des gekürzten Knorpel-Knochen-Zylinders.

### III.6.1. Diamond Bone Cutting System

Die Entwicklung von Diamanthohlfräsen geht auf die Geschwister Draenert und deren Untersuchung über die Histomorphologie der Knochenheilung zurück (Draenert und Draenert, 1987). Durch eine Innenkühlung unter Wasserdruck (Prinzip des atraumatischen Nassschleifens) werden Hitzenekrosen vermieden und Abriebmaterial entfernt, wodurch ein möglichst artefaktfreier, vitaler Transplantatzylinder und ein unversehrtes Implantatlager realisiert werden kann.

Das komplette Instrumentarium besteht aus einem Adapter für die Bohrmaschine, den diamantbeschichteten Hohlschleifen in unterschiedlichen Größen und dazugehörigen Extraktoren mit Handgriff, Ausschlagstößeln und Applikatoren. In der vorliegenden Arbeit kam eine Fräse mit einem Außendurchmesser von 4,5 mm zur Anwendung.

Hauptindikationen für den Einsatz von Diamanthohlfräsen in der Humanmedizin sind die Entnahme von Knochenbiopsien und autogenem Knochenmaterial für Knochen-Knorpeltransplantationen (z. B. bei Osteochondrosis dissecans, traumatischen Knorpelschäden, Femurkopfnekrose) sowie im Rahmen von Bandrefixationen, Arthrodesen u. a. (Anders et al., 2001; Baltzer et al., 2000; Horas et al., 2001; Peterson et al., 2003; Rittmeister et al., 2005; Soldner, 1999).

Bei Knorpel-Knochen-Transplantationen wird zunächst ein Implantationslager geschaffen, das den Defektbereich umfasst. Der Transplantatzylinder wird dann mit der nächst größeren Hohlschleife, beispielsweise von einer Rand- oder Übergangszone der Gelenkfläche entnommen. Der in seinem Durchmesser um wenige Hundertstel Millimeter größere Zylinder kann dann im Sinne einer *Press-fit*-Verdübelung ohne weitere Stabilisierung im Lager verankert werden (Angeskirchner et al., 2001).

### **III.7. Postoperative Maßnahmen**

Neun Kaninchen aus den clindamycinhaltigen Gruppen 3 und 4 entwickelten postoperativ eine breiige Diarrhö. Die Infusionstherapie erfolgte subkutan mit Ringerlösung und 10%-iger Glucose. Bei Verdacht auf eine Cryptosporidieninfektion erhielten diese Tiere vom dritten bis fünften postoperativen Tag eine intramuskuläre antibiotische Therapie mit Sulfadoxinum und Trimethoprim (12,5 mg/kg KG bzw. 2,5 mg/kg KG; Borgal® 7,5%; Hoechst AG). Bei zwei Tieren wurde die Therapie auf fünf Behandlungstage ausgedehnt.

Die Femura verstorbener Tiere (s. Seite 78 und 133 ff.) lagerten bis zur Bestimmung der lokalen Clindamycinkonzentrationen bei –18 °C und wurden dann zusammen mit den elektiv euthanasierten Tieren weiter aufbereitet.



### **III.8. Postoperative Blutentnahme**

Zur Bestimmung der systemischen Clindamycinkonzentrationen fanden zwei, vier, acht, 24, 48 und teilweise 72 Stunden postoperativ Blutentnahmen durch die Punktion einer Ohrarterie oder in einigen Fällen der Vena saphena magna der nicht operierten Hüftgliedmaße statt (ca. 1,5 ml Vollblut). Das abzentrifugierte Serum (5 Min.; 4000 Umdrehungen/min) lagerte bis zur Konzentrationsbestimmung bei  $-18^{\circ}\text{C}$  in Eppendorfröhrchen. Insgesamt wurden 94 Serumproben analysiert.

Um Fehlbestimmungen durch die oben genannte parenterale antibiotische Therapie zu vermeiden, wurden die so behandelten Tiere von den Blutentnahmen ausgeschlossen.

### **III.9. Polychrome Sequenzmarkierung**

Zur zeitlichen Interpretation der postoperativen Knochenregeneration fand bei den Tieren der Gruppen 1, 2 und 4 eine intravitale polychrome Sequenzmarkierung mit den Fluorochromen Calceingrün und Alizarinkomplexon statt, wie in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

*Tabelle 4: Knochenmarkierungsschema mit Fluorochromen.*

Gruppe	Markierungssubstanz	Markierungszeitpunkt (Tag postoperativ)	Nachbeobachtungszeit (Tage)
<b>1</b> (Ostim <sup>®</sup> )	Calceingrün	7 + 10	14
<b>2</b> (Ostim <sup>®</sup> )	Calceingrün	7 + 10	28
	Alizarinkomplexon	21 + 26	
<b>3</b> (Ostim <sup>®</sup> plus)	keine Färbung		14
<b>4</b> (Ostim <sup>®</sup> plus)	Calceingrün	7	28
	Alizarinkomplexon	21 + 26	

Die Fluorochromfarbstoffe gehören zur Gruppe der Chelatbildner und gehen eine Komplexbindung mit neu gebildetem Knochenmineral ein. Sie reichern sich in der Mineralisationsfront bzw. den Resorptionszonen des Knochens an und fluoreszieren bei Bestrahlung mit ultravioletterem Licht (Rahn, B. A., 1976).

Eine intravitale polychrome Sequenzmarkierung ermöglicht so die fluoreszenzoptische Darstellung der knöchernen Heilungsdynamik. Die Verwendung des im Vergleich zu Alizarin besser verträglichen Alizarinkomplexon ermöglichte die Minimierung von systemischen und lokalen Nebenwirkungen, wie beispielsweise ein negativer Einfluss auf die Osteogenese (Rahn, B. A. und Perren, 1972; Rahn, B. V. et al., 1980).

Die Tiere der Gruppen 1, 2 und 4 erhielten Calceingrün (10 mg/kg KG) und Alizarinkomplexon (20 mg/kg KG) subkutan nach Abpufferung mit 2%-iger Natronlauge (0,5 ml/kg KG).

Auf Grund des schlechten Allgemeinzustandes der Tiere aus den clindamycinhaltigen Gruppen 3 und 4 wurde hier auf eine Fluorochrommarkierung ganz bzw. bei Gruppe 4 auf die zweite Calceingrünmarkierung des zehnten postoperativen Tages verzichtet (s. a. Ergebnisse - „Klinische Befunde“, Seite 78 und Diskussion – „Tier- und Operationsmodell“, Seite 133).

### ***III.10. Euthanasie***

Nach intramuskulärer Anästhesie (Ketamin: 35 mg/kg KG; Hostaket<sup>®</sup>; Hoechst Roussel Vet. und Xylazin 2%: 5 mg/kg KG; Rompun<sup>®</sup>; Sanofi Ceva GmbH) erfolgte die schmerzfreie Euthanasie durch intrakardiale Applikation von ca. 3 ml T 61<sup>®</sup> (Embutramid, Mebezonium, Tetracain; Hoechst Roussel Vet). Nachfolgend wurden die operierten Femura entnommen.

Bei den Tieren der clindamycinhaltigen Gruppen 3 und 4 fand unter Anästhesie zuvor eine kardiale Punktion zur Gewinnung von ca. 10 ml Blut je Gruppe für die späteren Antibiotikumkonzentrationsbestimmungen statt (s. Seite 73).

### ***III.11.     Röntgendokumentation***

Röntgenaufnahmen der entnommenen Femura im antero-posterioren und seitlichen Strahlengang ermöglichten die Lokalisation der proximalen Implantatbegrenzung und dienten der Dokumentation (Hartstrahltechnik; Beschleunigungsspannung: 58 kV; Expositionszeit: 8 mAs; Film-Fokus-Abstand: 90 cm; Film: Kodak Super 2000-G/Grün; 18x24).



*Abbildung 10: Postoperative Röntgenaufnahme nach Implantation von Ostim® plus (seitlicher Strahlengang). Das Implantat (O) füllt den Markraum des distalen Femurdrittels aus. F=Femur. P=Patella. T=Tibia.*



*Abbildung 11: Röntgenkontrolle (a. p.) nach Entnahme des Femurs (Implantat: Ostim® plus; Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen). Etwas weniger dicht erscheinendes Ostim® plus (O), das den Markraum des distalen Femurdrittels weiterhin größtenteils ausfüllt. Kein Nachweis von Osteolysen. FP=femoropatellares Gleitlager. FD=Femurdiaphyse. FC=Femurkondyle.*



Abbildung 12: Korrespondierende seitliche Aufnahme zu Abbildung 11. Pfeil: proximale Begrenzung des Ostim<sup>®</sup> plus.

### **III.12. Aufarbeitung der Femura**

Die Femura der Gruppen 1 und 2 (Ostim<sup>®</sup>) wurden nach ihrer Entnahme subtrochantär quer durchtrennt, um die Perfusion mit Karnovskylösung bei der nachfolgenden Fixation zu verbessern.

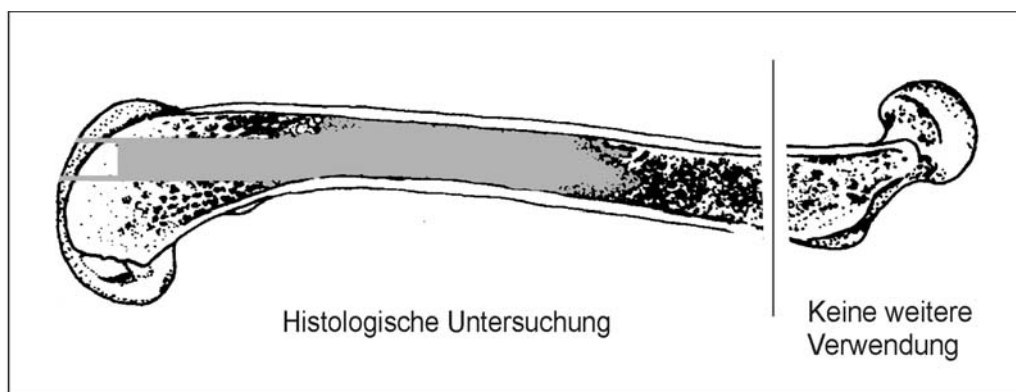


Abbildung 13: Subtrochantäre Eröffnung der femuralen Markraumhöhle zur Perfusionsverbesserung bei Gruppe 1 und 2.

Bei den Präparaten der Gruppe 3 und 4 (Ostim<sup>®</sup> plus) wurde das diaphysäre Implantationsgebiet für die Clindamycinkonzentrationsbestimmungen verwendet. Die Kondylenregion und die distale Diaphyse standen mikroskopischen Untersuchung zur Verfügung (s. Abbildung 14 auf der folgenden Seite).

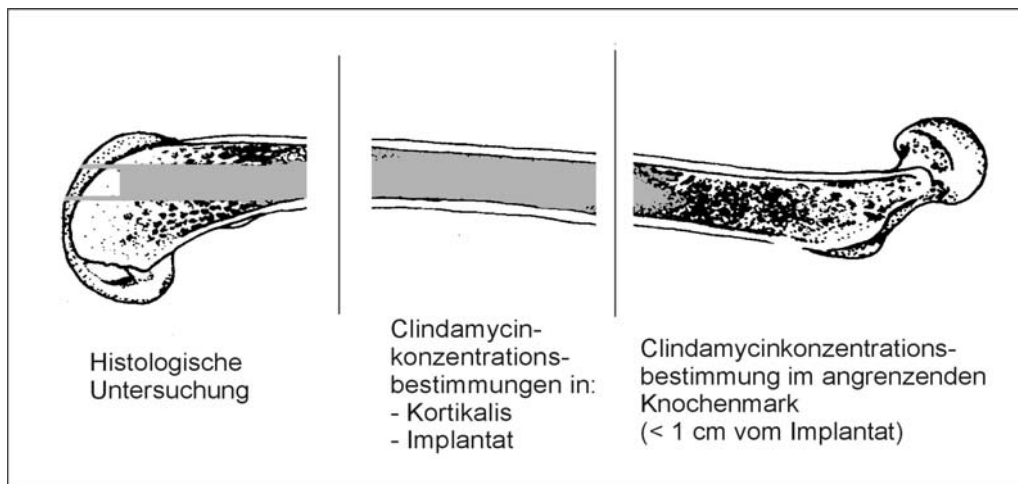


Abbildung 14: Aufarbeitung der Femura aus Gruppe 3 und 4 (Ostim<sup>®</sup> plus).

Die Präparate für die histologische und fluoreszenzmikroskopische Befundung wurden zur Fixation in Karnovskylösung (+4 - +8 °C) gegeben. Nach einer Woche konnte von einer ausreichenden Verfestigung der Präparate ausgegangen werden, sodass die Präparate nach dieser Zeit mit einer Konradsäge mittig in der Femurschaftlängsachse durchtrennt und die medialen und lateralen Kondylenregionen (ca. 3 mm) zur Perfusionsverbesserung abgetrennt wurden. Bis zur Herstellung der Knochenschliffe nach drei bis zehn Wochen lagerten die Proben bei +4 - +8 °C in Karnovskylösung.

### **III.13. In-vitro-Elutionsversuch**

Um einen Teflonstab (Durchmesser: 6 mm) wurde Siebdruckgewebe (Nylon monofilament; Maschenweite 40 µm, DIN110-50; Fa. Brückmann GmbH, Mönchengladbach) gelegt und mit Uhu-Alleskleber (Fa. Uhu) zu einem Schlauch verklebt. Ein Ende der ca. 3,5 cm langen Schlauchstücke wurde ebenso zugeklebt und die sechs Beutel anschließend mit durchschnittlich 516,18 mg Ostim<sup>®</sup> plus 25 (SD: 11,13 mg) eingewogen. Das offene Ende wurde mit Nylonschnur zugebunden.

Tabelle 5: Probeneinwage des In-vitro-Elutionsversuches.

Proben-Nr.:	Ostim® plus 25 (mg)
1	526,6
2	529,9
3	514,0
4	501,2
5	506,8
6	518,6
Mittel	516,18
SD	11,13

Die dreitägige Elution der Beutel fand im Reagenzglas mit jeweils 5 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) statt. Ein kompletter Wechsel des Elutionsmediums durch Überführung der Beutel in neue Reagenzgläser erfolgte in den ersten acht Stunden stündlich, anschließend nach 24, 48 und 72 Stunden. Insgesamt wurden 66 Eluatproben analysiert.

Bis zur Clindamycinkonzentrationsbestimmung mit dem nachfolgend erläuterten Aggardiffusionstest lagerten die Proben bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **III.14. Clindamycinkonzentrationsbestimmungen**

Hierbei kam der Agardiffusionstest (Testkeim: *Sarcina lutea*; ATCC 9431/9341) zur Anwendung. Auf bakteriell beimpften Agarplatten (Antibiotikaagar Nr. 5; pH: 7,4; Fa. Merck; 107 CFU/ml) entwickelten sich um die aufgetragenen Proben herum, abhängig vom Clindamycingehalt, unterschiedlich große Hemmhöfe. Durch Vergleich mit den Hemmradien von Eichproben mittels einem Ablesegerät (Bioeye, Fa. ISRA; Darmstadt) errechnete sich die Clindamycinkonzentration (Nachweisgrenze:  $0,2\text{ }\mu\text{g/ml}$ ). Jede Probe wurde insgesamt sechs Mal aufgetragen und aus den Einzelwerten der arithmetische Mittelwert gebildet.

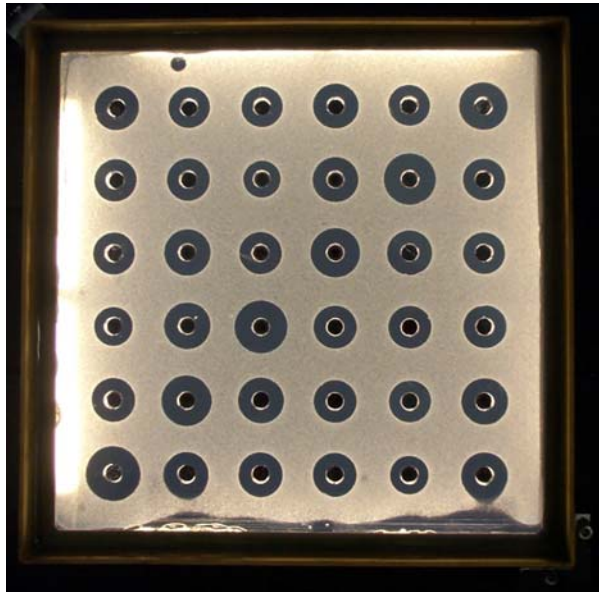


Abbildung 15: Agarplatte mit unterschiedlich großen Hemmhofdurchmessern nach Beimpfung mit Stammlösungen und clindamycinhaltigen Proben.



Abbildung 16: Ablesegerät Bioeye (Fa. ISRA; Darmstadt) zur Bestimmung der Clindamycinkonzentrationen anhand des Hemmhofdurchmessers von *Sarcina lutea*-beimpften Agarplatten.

Es fanden Bestimmungen in folgenden Proben statt:

- Gewebe- bzw. Implantatproben aus dem Implantationsgebiet von 18 Tieren aus Gruppe 3 und 4 (Ostim<sup>®</sup> plus):
  - Implantatumgebende diaphysäre Kortikalis
  - proximal implantatangrenzendes Knochenmark (innerhalb ca. 1 cm)
  - Ostim<sup>®</sup>-Paste aus dem Implantationsgebiet
- 94 Serumproben aus postoperativen Blutentnahmen (Gruppe 3 und 4)
- 66 Elutionslösungen aus dem In-vitro-Elutionsversuch

### III.14.1. Nährboden und Testkeim

Die Kultivierung von *Sarcina lutea* (ATCC 9431/9341) erfolgte drei Tage vor Versuchsbeginn auf Blutagarplatten (24 Stunden im Brutschrank). Mit einer Impföse (10 µl) wurden 100 ml Nährbouillon beimpft und bei +37 °C für 18 Stunden bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase inkubiert. Jeweils 12 ml dieser Bakteriensuspension wurden anschließend im Erlenmeyerkolben mit 600 ml Nähragarlösung (Antibiotikaagar Nr. 5; Fa. Merck, ca. 56 °C) vermengt.

Nach Ausgießen des Testagars (ca. 100 ml) auf vorgewärmten, umrahmten Glasplatten (26,5 x 26,5 cm), Auskühlen bei Zimmertemperatur und Lagerung bei +4-+8 °C folgte die Probenbeschickung innerhalb von ca. acht Stunden. Zuvor wurden in die Agarplatten jeweils 36 Probenlöcher (8 mm Durchmesser) mittels Schablone und sterilem Stahlstift eingestantzt. In jeweils dreifacher Ausführung wurden pro Platte sechs Proben, eine Referenzstammlösung sowie fünf Standardlösungen aufpipettiert (s. u.).

### III.14.2. Probenaufarbeitung

Die Probenapplikation auf die Testplatten erfolgte in flüssiger Form (20 µl Probenflüssigkeit), um Vergleiche mit den ebenfalls flüssigen Referenzlösungen zu ermöglichen.

Die Knochen-, Knochenmarks- und Implantatproben wurden aufgetaut und für 24 Stunden bei +37 °C in 1/15-molarem Phosphatpuffer (dreifache Menge des Probeneigengewichtes) eluiert. Bezüglich pH-Wert und Osmolarität weist dieser ähnliche Werte, wie das zu eluierenden Gewebe auf (pH=7,4). Durch Diffusion und Braunsche Molekularbewegung glichen sich Konzentrationsunterschiede zwischen Eluat und Proben aus. Eine Pulverisierung der Proben fand nicht statt.

Die Konzentration in den Eluatproben betrug auf Grund der Verdünnung ein Viertel der ursprünglichen Clindamycinkonzentration in der Probe. Vor der Bestimmung wurden die Lösungen noch einmal aufgerührt und anschließend aus dem sich bildenden Überstand 20 µl auf die Testplatten aufpipettiert. Die Serumproben konnten nach Erwärmung und Aufrühren ohne weitere Bearbeitung nach unten beschriebenen Schema auf die Platten aufgebracht werden.



### III.14.3. Referenzlösungen

Eine Clindamycinstammlösung mit einer Konzentration von 10 µg/ml (30 mg Clindamycinhydrochlorid, entsprechend 25 mg Clindamycinbase, gelöst in 250 ml VE-Wasser) wurde zeitgleich zu den entnommenen Proben bei –18 °C aufbewahrt, um Verfälschungen beim Einfrieren auszuschließen (Becker, 1986). Durch schrittweise Verdünnung entstanden vor Versuchsbeginn fünf Standardlösungen mit absteigenden Clindamycinkonzentrationen (5,0-0,3125 µg/ml). Als Verdünnungsmedium diente bei den Serumprobenbestimmungen reines Serum, das aus der bereits beschriebenen kardialen Punktion der Kaninchen stammte (s. Seite 66). Im zuvor durchgeführten Agardiffusionstest wies dieses keinen Antibiotikumgehalt auf. Für die Standardlösungen der eluierten Proben (Eluatstandards) wurde das Serum mit der dreifachen Menge 1/15-molarem Phosphatpuffer vermennt, um eine ähnliche Zusammensetzung wie in den Eluatproben zu erhalten.

Vortests stellten sicher, dass die Konzentrationen der Standardlösungen im Konzentrationsbereich der Proben lagen. In dem ermittelten Bereich wurden dann geringe Konzentrationsunterschiede zwischen den Stammlösungen gewählt, um möglichst genaue Messwerte zu ermitteln.

Um Fehler bei der Herstellung der Stammlösung auszuschließen, wurde eine Referenzstammlösung durch erneutes Mischen von 25 mg Clindamycinbase mit 250 ml VE Wasser hergestellt. Deren Aufbewahrung erfolgte auf die gleiche Weise, wie bei den Proben (–18 °C). Vor Versuchsbeginn fand eine Verdünnung mit den jeweiligen Verdünnungsmedien auf eine mittlere Stammlösungskonzentrationen von 1,25 µg/ml statt. Wie Vortests zeigten, waren in diesem Bereich die Konzentrationen der meisten Proben zu erwarten.

### ***III.15.     Mikroskopische Untersuchungen***

Eine histologische und fluoreszenzoptische Befundung erfolgte an den operierten Femura der 18 elektiv euthanasierten Tiere. Die Untersuchungen an frühzeitig verstorbenen Tieren beschränkten sich auf Clindamycinkonzentrationsbestimmungen.

#### **III.15.1. Die Trenn-Dünnschlifftechnik nach Donath und Breuner**

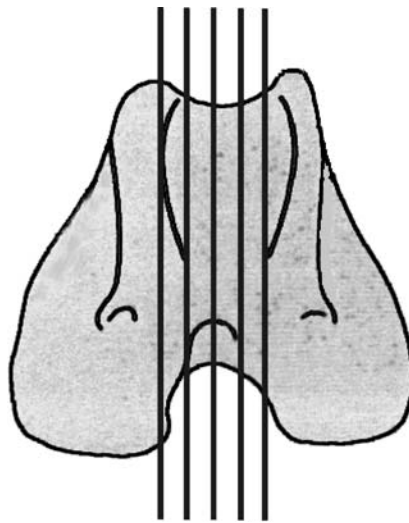
Die mikroskopischen Untersuchungen fanden an ca. 20-70 µm dünnen Knochenschnitten, hergestellt nach der Trenn-Dünnschlifftechnik nach Donath und Breuner (Donath, 1989), statt.

Zunächst entwässerten die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 bis 100% Ethanol) über 21 Tage. Es folgte die Infiltration mit flüssigem lichthärtendem Einkomponentenkunststoff auf Methacrylatbasis in einer aufsteigenden Technovitreihe (30–100%) über 30 Tage (Technovit 7200 VLC; Kulzer & Co GmbH). In der letzten Woche erfolgte der Zusatz von BPO (Hauptbestandteil: Dibenzoylperoxid (DBPO); Kulzer & Co GmbH), um die nachfolgende Lichtpolymerisation zu beschleunigen. Diese erfolgte unter dreistündiger Bestrahlung mit weißem Licht und nachfolgender Bestrahlung mit energiereicherem Blaulicht (Wellenlänge: 450nm) für weitere drei Stunden. Diese Vorgehensweise sollte die Ausbildung von Spannungsrissen verhindern. Im Wärmeschrank härteten die Blöcke bei +46 °C für ca. zwölf Stunden weiter aus.

Jede Femurhälfte lieferte jeweils zwei, möglichst medial gelegene Schnitte. Nachdem die Knochenblöcke auf Plexiglasobjektträger aufgeklebt waren (Kleber: Technovit 4000; Kulzer & Co GmbH), konnten diese am Vakuumhalter des Mikroschleifsystems (Fa. Exakt Apparatebau) befestigt werden. Die medialen Schnittflächen der Knochenhälften wurden nun so lange plangeschliffen, bis die Konturdifferenzen höchstens 4 µm betrugen.

Es folgte eine ca. 15-minütige Trocknungsphase im beheizten Vakuum. Danach fand die Fixierung des Blocks mit der zu untersuchenden Fläche auf einem weiteren Plexiglasobjektträger statt (lichthärtender durchsichtiger Kleber; Technovit 7230 VLC; Kulzer & Co GmbH).

Mit einer Diamantbandsäge (Exakt-Trennschleifsystem; Sägeblattdicke: 20 µm; Körnung D64) wurde ein Knochenschnitt von ca. 250 µm Dicke auf dem Objektträger hergestellt. Mittels Mikro-Schleifgerät (Körnung: 1200) entstanden Schnitte von ca. 20–70 µm Dicke, die abschließend poliert wurden (Körnung: 5000).



*Abbildung 17: Schnittführung zur Herstellung der Knochenschnitte für die histologische Befundung. Schnittdicke: 250 µm. Quelle: Eigener Entwurf.*

Vor der Herstellung des zweiten Schnittes erfolgte eine Trocknung im Wärmeschrank von ca. einer Stunde. Anschließend wurde die mediale Oberfläche der Knochenhälfte durch Aufpipettieren von Technovit 7200 VLC (Kulzer & Co GmbH) und anschließender Blaulichtpolymerisation nachbehandelt. Es folgte die Herstellung der Schnitte in oben beschriebener Weise.

### **III.15.2. Toluidinfärbung**

Dieser basische Thiazinfarbstoff markiert acidophile Strukturen wie beispielsweise Zellkerne ((Desoxy-)Ribonukleinsäuren), saure Mukopolysaccharide und Glykosaminoglykane (Osteoid, Knochen) in unterschiedlichen Blautönen (Metachromasie) (Donath, 1989).

### **III.15.3. Mikroskopie**

Die lichtmikroskopische Befundung an toluidingefärbten Trenn-Dünnschliffen erfolgte an einem AXIOPLAN-II-Mikroskop (Fa. Zeiss) bei 1,25-, 2,5-, 10-, 20-, 40- und 100-facher (Immersionsöl 518 C, Fa. Zeiss) Objektiv- und zehnfacher Okkularvergrößerung. Als Lichtquelle diente eine 100 Watt Halogenleuchte (HAL 100; Fa. Zeiss).

Die fotografische Dokumentation der Hellfeldmikroskopie wurde mit AXIOPHOT-II und einem Kunstlichtfilm (Ektachrome T 64; Fa. Kodak) sowie mit einer aufgesetzten Digitalkamera (Fa. Sony) durchgeführt.

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen diente eine HBO 103 Fluoreszenzlampe (Fa. Zeiss) als Auflichtquelle. Ein zwischengeschalteter „set 25“-Dreifach-Filter (Fa. Zeiss) optimierte das Anregungsspektrum (Erregungsfilter TBP; Erregungsmaximum 410/505/585 nm; Farbteiler FT; 395/485/560 nm) und filterte das von den Fluorochromen emittierte Licht (Emissionsfilter TBP; 460/530/610 nm).

Die fotografische Dokumentation der Fluoreszenzmikroskopie fand mit dem Kunstlichtfilm 320T (Fa. Kodak) sowie dem Tageslichtfilm Fujichrome PROVIA 400 F (Fa. Fuji) statt.

### **III.16. Graphische Darstellungen und Bilddokumentation**

Die Erstellung eigener Schaubilder sowie die Bearbeitung und Beschriftung von Abbildungen wurden mit Adobe® Photoshop® Version 6.0 sowie CorelDRAW™ Version 8.369 durchgeführt.

### ***III.17.     Statistische Auswertung***

Die Analyse der Daten erfolgte im explorativen Sinne, sodass nicht von Signifikanz gesprochen wird. Die angegebene berechnete Wahrscheinlichkeit für das jeweilige beobachtete oder ein extremeres Ereignis ist, unter der Annahme, dass kein Unterschied besteht, ein Maß für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Die lokalen Clindamycinkonzentrationen wurden auf Grund geringer Stichprobenumfänge und großer Variabilitäten rein deskriptiv beschrieben. Werte unter der Nachweisgrenze von 0,2 µg/g gingen mit dem Wert 0,1 in die Berechnung des Medians und der Range ein. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Arbeiten zu ermöglichen, wurde im Kapitel Diskussion – „Antibiotika-trägersysteme im pharmakokinetischen Vergleich“, Seite 161, der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Die Daten des In-vitro-Elutionsversuches sowie der postoperativen Gewichtsentwicklung folgten der Normalverteilung, sodass hier das arithmetische Mittel mit Standardabweichung bzw. der Standardfehler zur Anwendung kam.

Bei den postoperativen Serumspiegeln lag eine Log-Normalverteilung vor, sodass diese mittels geometrischem Mittel und 2s-Intervall ausgewertet wurden. Das paarweise Testen mit dem t-Test für unabhängige Stichproben sowie die Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeiten erfolgte mit den logarithmierten Einzelwerten, um das Testkriterium einer Normalverteilung zu erfüllen.

Durch letale Komplikationen sowie Ausschluss von Tieren nach Antibiotikagabe entstanden Unterschiede in den Stichprobenumfängen. Diese sind in der graphischen Darstellungen der postoperativen Serumspiegel mit aufgeführt.

Für die Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm ORIGIN (Version 6,0) sowie STATISTICA ('99 Edition; Kernel-Version 5,5 A) verwandt.

## **IV. ERGEBNISSE**

### **IV.1. Klinische Befunde**

#### **IV.1.1. Gruppe 1 und 2 (Ostim<sup>®</sup>)**

Der postoperative Verlauf dieser Tiere war komplikationslos. Es erfolgten tägliche klinische Kontrollen. Die Kaninchen begannen ca. drei Stunden postoperativ mit der Wasser- und Nahrungsaufnahme und zeigten eine kontinuierliche Aktivitätszunahme. Wundheilungsstörungen traten nicht auf.

#### **IV.1.2. Gruppe 3 und 4 (Ostim<sup>®</sup> plus)**

Nach anfänglich unauffälligem postoperativem Verhalten wiesen die Tiere am zweiten postoperativen Tag einen reduzierten Allgemeinzustand mit geringer Futteraufnahme und erniedrigtem Aktivitätsniveau auf.

Neun Tiere entwickelten eine breiige Diarrhö ohne Blut- und Schleimbeimengungen. Bei der klinischen Untersuchung fanden sich Dehydratationszeichen, die Körpertemperaturen waren normal bis subfebril (max. 38,9 °C; Normbereich: 37,5-38,5 °C). Trotz subkutaner Infusionstherapie (Ringerlactatösung und 10%-ige Glucose) verstarben sechs Tiere am zweiten und zwei am achten postoperativen Tag. Ein Tier überstand die Diarrhö. Tiere mit 10 bzw. 20%-iger Clindamycinaktivität erkrankten zu gleichen Anteilen. Es verstarben jeweils vier Tiere aus Gruppe 3 und 4. Die postmortale Untersuchung zweier Tiere (s. pathologischer Befundbericht, Seite 208) stellte eine enterokolische Dysbiose mit massenhaftem Auftreten von *Escherichia coli* im Dick- und Dünndarm sowie *Clostridium tertium* im Dünndarm fest. Eine Splenomegalie, petechiale Darmwandblutungen sowie eine blaurote verfärbte Trachealschleimhaut wiesen auf einen septischen Krankheitsverlauf hin.

Ein Tier entwickelte vom dritten bis achten postoperativen Tag eine oberflächliche, eitrig Wundinfektion, die unter lokaler antiseptischer Therapie mit Povidon-Iodlösung (Braunol<sup>®</sup> 2000 Lösung; B. Mehlungen AG) abheilte.

Die Operationswunden der übrigen Tiere heilten komplikationslos. Serombildungen, Gelenkluxationen oder andere Wundheilungsstörungen waren nicht zu beobachten.

## **IV.2. Makroskopische Befunde**

Die Kniegelenke der operierten Hintergliedmaßen waren makroskopisch bei allen Tieren reizlos und frei von Implantatmaterial. Das Knochengewebe wies eine leichte Grün- (Gruppe 1) bzw. Rotfärbung (Gruppe 2 und 4) auf. Bei zwei Tieren der Gruppe 2 war eine spindelförmige Verdickung des distalen Femurknochens zu beobachten.

Im Markraum lag das Implantat zwei Wochen postoperativ überwiegend kompakt, nach vier Wochen in den Randbereichen grobschollig zerfallen vor. Über den Versuchszeitraum waren eine zunehmende Viskositätsabnahme und eine braun-rötliche Verfärbung der Ostim®-Paste zu beobachten.

Die folgenden Abbildungen zeigen den makroskopischen Aspekt der medial eröffneten Femura nach zwei- bzw. vierwöchiger Implantation von Ostim® und Ostim® plus.

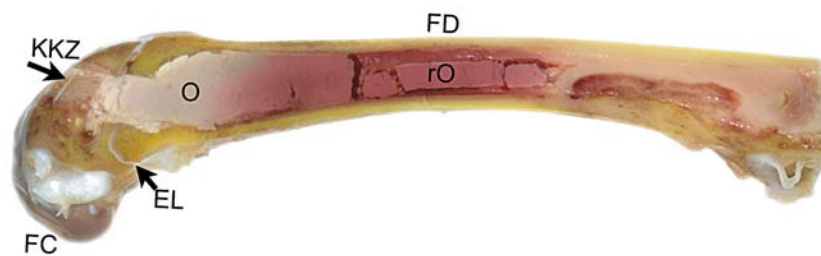


Abbildung 18: Formschlüssige Defektausfüllung durch homogenes Implantat/Ostim® (O), das im Bereich der femuralen Diaphyse (FD) zunehmend rötlich gefärbt ist (rO). Der Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) ist minimal im Implantationskanal abgesunken (Pfeil). EL=Epiphysenlinie, FC=Femurkondyle. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

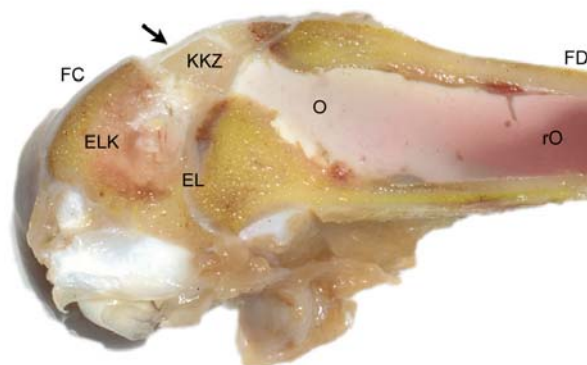


Abbildung 19: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 18. Formschlüssige Defektausfüllung durch homogenes Implantat/Ostim® (O), das im Bereich der femuralen Diaphyse (FD) zunehmend rötlich gefärbt ist (rO). Der Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) ist minimal im Implantationskanal abgesunken (Pfeil). ELK=Epiphysärer Lagerknochen. EL=Epiphysenlinie. FC=Femurkondyle. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

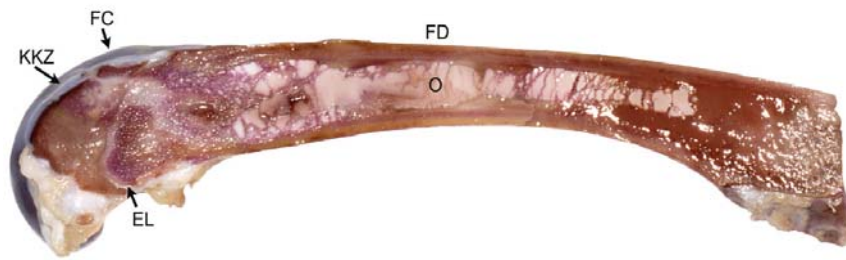


Abbildung 20: Alizarinrotgefärbte Knochenneubildungen, insbesondere Epi- und Metaphysär (Rotfärbung). Implantat schollig zerfallen (O). EL=Epiphysenlinie, FC=Femurkondyle. KKZ=Knorpel-Knochen-Zylinder. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

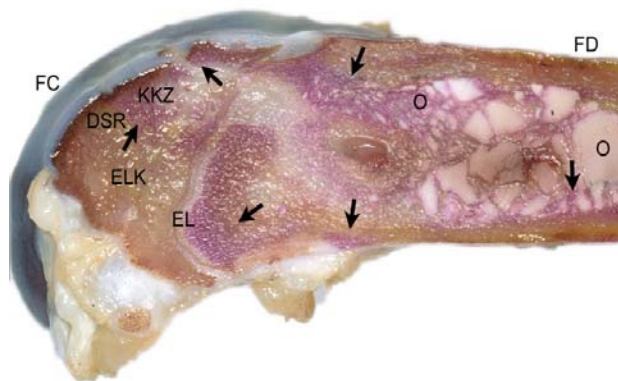


Abbildung 21: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 20. Alizarinrotgefärbte Knochenneubildungen (Pfeile), welche vom Lagerknochen aus das Implantat erschließen. Im Bereich der femuralen Diaphyse (FD) umwachsen diese das schollig zerfallene Ostim® (O). Im Bereich des dorsalen Spaltraumes (DSR) zwischen epiphysärem Lagerknochen (ELK) und Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) kommt es zu einer vollständigen knöchernen Überbrückung (s. a. Hellfeldmikroskopische Ergebnisse, Seite 81). Weiterhin formschlüssiger Ausfüllung der noch vorhandenen Hohlräume durch das Ostim® (O). EL=Epiphysenlinie. FC=Femurkondyle. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

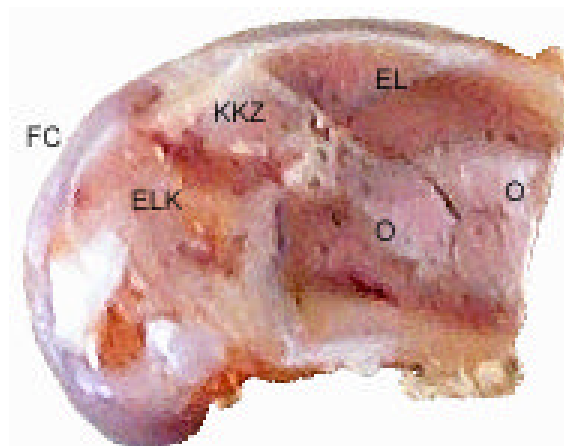


Abbildung 22: Gegenüber Gruppe 1 stärker aufgelockertes Ostim® (O). Replantiertem Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) mäßig im Implantationskanal abgesunken. Makroskopisch keine erkennbare nennenswerte Knochenneubildung. EL=Epiphysenlinie. FC=Femurkondyle. ELK=Epiphysärer Lagerknochen. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.



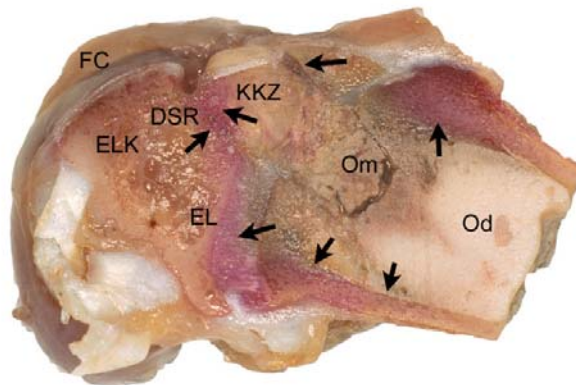


Abbildung 23: Alizarinrotgefärbte Knochenneubildungen (Pfeile), die vom Lagerknochen ausgehen und geringer ausgeprägt sind, als in der clindamycinfreien Vergleichsgruppe (Gruppe 2). Deutliche Knochenneubildung im dorsalen Spaltraum (DSR) zwischen epiphysärem Lagerknochen (ELK) und replantiertem Knorpel-Knochenzylinder (KKZ). Das Implantat liegt metaphysär aufgelockert vor (Om); diaphysär kompaktes Implantatmaterial (Od). FC=Femurkondyle. EL=Epiphysenlinie. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

### **IV.3. Hellfeldmikroskopische Ergebnisse**

#### **IV.3.1. Ostim®**

##### **IV.3.1.1. Gruppe 1 (Ostim® - Zwei Wochen postoperativ)**

Zwei Wochen postoperativ füllte das Implantat den Defektbereich sowie den diaphysären Knochenmarkraum größtenteils aus (s. Abbildung 24 und Abbildung 25).

Der zentrale diaphysäre Markraum enthielt überwiegend kompaktes, zellfreies Implantatmaterial, das zum Lagerknochen hin zunehmend mit Zellstraßen durchsetzt war. Diese enthielten Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen vom ungeordneten Typ, Erythrozyten, wenige segmentkernige Granulozyten und ovalkernige Zellen (DD undifferenzierte Mesenchymzellen, nicht aktive Osteoblasten, Fibroblasten; s. a. Diskussion, Seite 141). Sehr vereinzelt fanden sich Fibrozyten (s. Abbildung 32). Lagerknochennah drangen Gefäße in das Implantat vor (s. Abbildung 38 bis Abbildung 42). Zeichen einer spezifischen Entzündungsreaktion mit Ausbildung von Granulomen oder eine bindegewebige Einscheidung des Implantates waren nicht zu beobachten.

Im Bereich des epi- und metaphysären Lagerknochens war das Ostim<sup>®</sup> schollig bis granulär zerfallen und von Blutgefäßen, Zellen der oben beschriebenen Populationen und teilweise von Knochenneubildungen durchzogen (s. Abbildung 31 bis Abbildung 34). Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen vom ungeordneten Typ lagen den Ostim<sup>®</sup>-Partikeln vereinzelt direkt und formschlüssig auf (s. Abbildung 37 bis Abbildung 40).

Knochenneubildungen fanden sich insbesondere lagerknochennah, im Bereich der Fräskanten sowie im Bereich der replantierten Knorpel-Knochen-Zylinder. Osteogen aktive Zonen waren epiphysär bei zwei von vier Tieren, metaphysär bei allen (Dicke: max. ca. 500 µm) und diaphysär bei einem Versuchstier (ca. 200 µm) vorhanden. In einem Fall hatte eine nahezu vollständige trabekuläre Durchbauung des ca. 400 µm messenden Spaltraumes zur kondylären Spongiosa stattgefunden (s. Abbildung 24 bis Abbildung 27).

Osteoblasten und Osteoblastenlayer mit korrespondierenden Osteoidsäumen lagen Knochen- bzw. Zylindertrabekeln und zum Teil Ostim<sup>®</sup>-Stücken auf (s. Abbildung 28 und Abbildung 37). Vereinzelt wurden Ostim<sup>®</sup>-Stücke formschlüssig in neu gebildete Knochen-trabekel integriert (s. Abbildung 29 und Abbildung 35).

Die Knochenneubildungen wiesen lagerknochennah eine lamelläre Struktur und in der Toluidinfärbung eine hellblaue Farbe auf. Den Trabekeln waren Osteoblastenlayer mit Osteoidsäumen aufgelagert. Die Intertrabekularräume enthielten zahlreiche Osteoblasten, ovalkernige Zellen, Blutgefäße und Makrophagen (s. Abbildung 26 bis Abbildung 29). Zum Implantationskanal bzw. Implantat hin bestand eine typische Geflechtknochenneubildung mit ungerichteter Osteoidproduktion durch diffus verteilte Osteoblasten (s. Abbildung 33 bis Abbildung 35). Der neu gebildete Knochen war osteozytenreich, tiefblau gefärbt und ging in eine ungefärbte Fasermatrix über (s. Abbildung 36). Diese wies zahlreiche Osteoblasten und ovalkernige Zellen auf.

Das Ostim<sup>®</sup> wies in osteogen aktiven Zonen eine Toluidinfärbung auf (s. Abbildung 24 und Abbildung 29). In Bereichen ohne reparative Knochenneubildung war es ungefärbt und grenzte mit direktem Kontakt an die Fräskanten bzw. das diaphysäre

Endost (s. Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 31, Abbildung 41 und Abbildung 42).

Die replantierten Knorpel-Knochen-Zylinder waren ca. maximal 1 mm im Implantationskanal abgesunken (s. Abbildung 24 und Abbildung 25). Die Zylindertrabekel wiesen umgebende Osteoblastenlayer und intertrabekuläre Blutgefäße auf. Vereinzelt war eine osteoklastäre Knochenresorption zu beobachten (s. Abbildung 30).

Der Lagerknochen stellte sich vital, mit hellblauer Toluidinfärbung und trabekelumgebenden Osteoblastenlayern sowie osteozytenbesetzten Knochenhöhlen dar (s. Abbildung 26 und Abbildung 27). Das diaphysäre Knochenmark war frei von entzündlichen Infiltrationen und Fibrosierungen.

#### **IV.3.1.2. Bilddokumentation – Hellfeldmikroskopie Gruppe 1** **(Ostim® – Zwei Wochen postoperativ)**

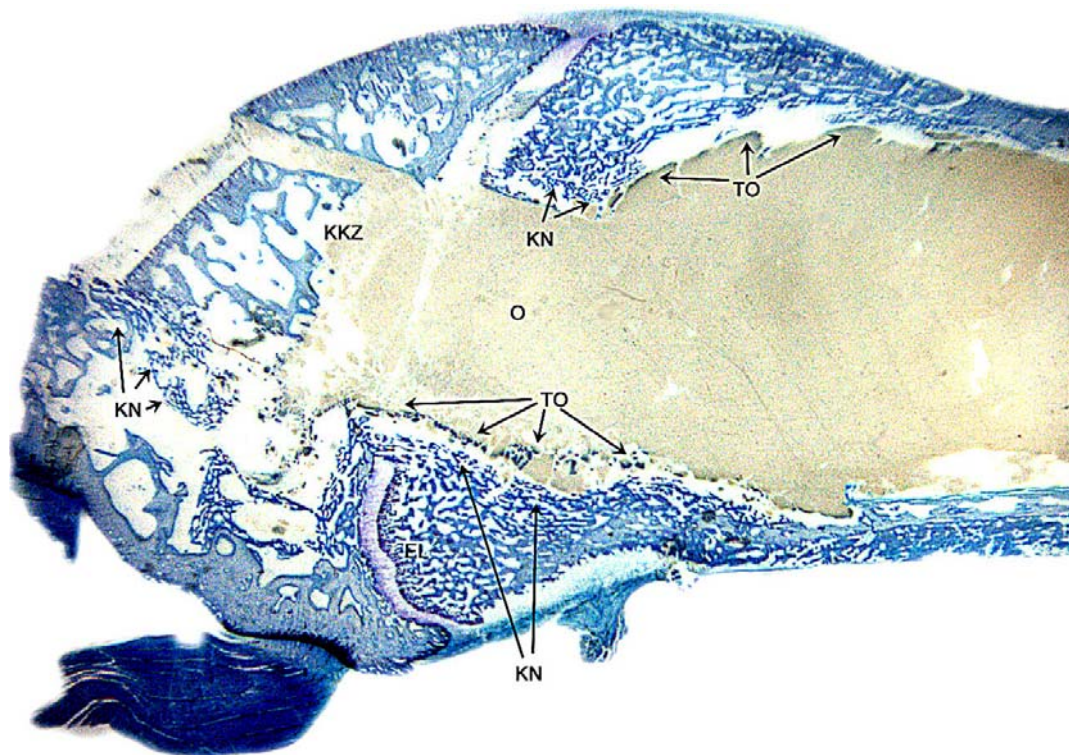


Abbildung 24: Formschlüssig aufgefüllter Defekt- und Markraum mit größtenteils ungefärbtem Ostim® (O). Der Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) ist geringgradig im Implantationskanal abgesunken. Knochenneubildungen (KN) im dorsalen Spaltraum. An metaphysäre Knochenneubildungen angrenzende Toluidinfärbung des Ostim® (TO). EL=Epiphysenlinie. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. Sechsfache Vergrößerung.



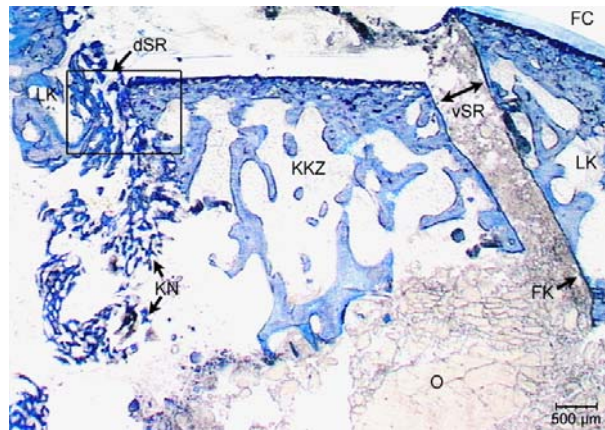


Abbildung 25: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 24. Dorsaler Zylinder-Lagerknochen-Spaltraum (dSR) mit deutlicher trabekulärer Knochenneubildung (KN) (s. a. Ausschnittvergrößerung Abbildung 26 und Abbildung 27). Ostim® im Bereich der Knochenneubildungen weitestgehend abgebaut, im ventralen Spaltraum (vSR) liegt dieses aufgelockert vor, im metaphysären Implantationskanal kompakte Implantatmasse (O). Ventrale Fräskante (FK) glatt; ohne Knochenneubildungen. FC=Femurkondyle. LK=epiphysärer Lagerknochen). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 12,5-fache Vergrößerung.

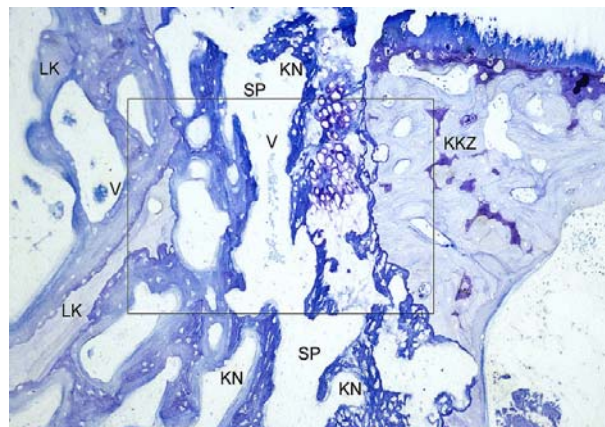


Abbildung 26: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 25. Dorsaler Spaltraum (SR) zwischen replantiertem Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) und epiphysärem Lagerknochen (LK). Sowohl vom Lagerknochen, als auch vom replantierten Zylinder ausgehende Knochenneubildung (KN). Kein Ostim® mehr nachweisbar. Longitudinal getroffenes Gefäß (V) im Spaltraum. Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 27. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 100-fache Vergrößerung.

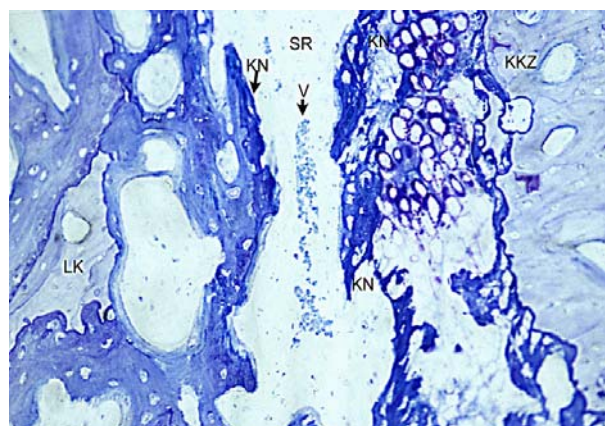


Abbildung 27: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 26. Dorsaler Spaltraum (SR) zwischen replantiertem Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) und epiphysärem Lagerknochen (LK). Sowohl vom Lagerknochen, als auch vom replantierten Zylinder ausgehende Knochenneubildung (KN). Kein Ostim® mehr nachweisbar. Longitudinal getroffenes Gefäß (V) im Spaltraum. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 200-fache Vergrößerung.

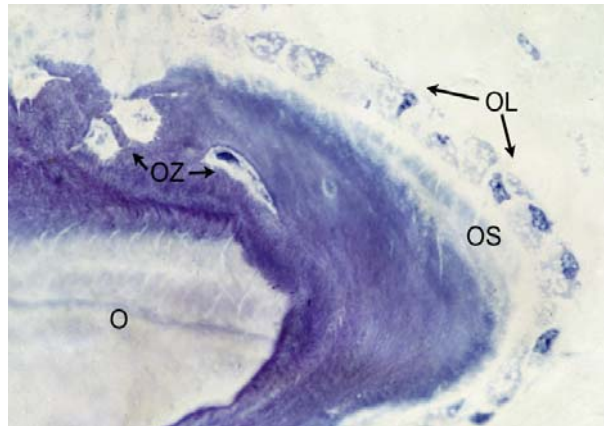


Abbildung 28: Knochenneubildung aus dem ventralen Spaltraum zwischen replantiertem Knorpel-Knochen-Zylinder und epiphysärem Lagerknochen. Osteoblastenlayer (OL) mit Osteoidablagerung (OS) auf Ostim® (O). Sich einmauernde Osteozyten (OZ). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

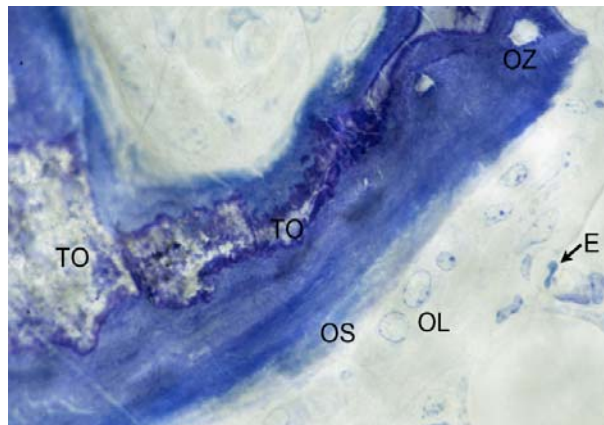


Abbildung 29: Epiphysäre lagerknochennahe Knochenneubildung auf beiden Seiten von toluidin-gefärbtem Ostim®, das hierdurch mit direktem Kontakt in das von Osteoblastenlayern (OL) gebildete lamelläre Osteoid (OS) integriert wird. OZ=Osteozytenhöhle. E=Erythrozyt. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

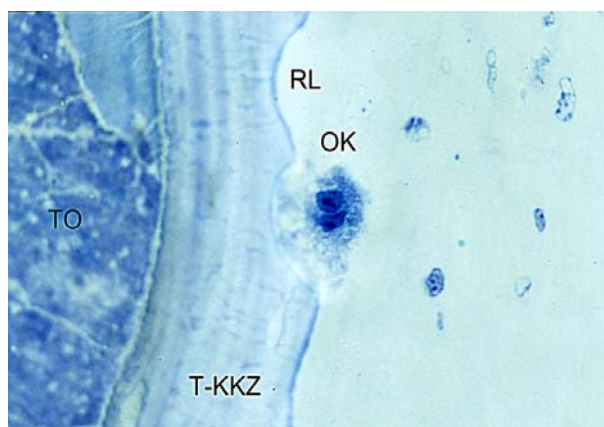


Abbildung 30: Knochentrabekel des replantierten Knorpel-Knochen-Zylinder (T-KKZ) nach der dorsalen Fräskante. Trabekelständiger mehrkerniger Osteoklast (OK) mit Resorptionslakune (RL). Intertrabekulär gelegenes toluidin-gefärbtes Ostim®. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.



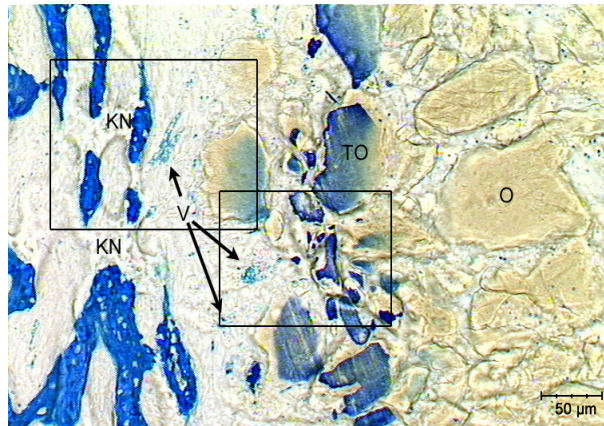


Abbildung 31: Diaphysentrichter mit vom Lagerknochen ausgehender Geflechtknochenneubildungen (KN) mit zellulärer und vaskulärer (V) Erschließung des schollig zerfallenen Ostim® (O). Die Toluidinmarkierung des Implantates (TO) beschränkt sich auf osteogenetisch aktive Zonen. Rahmen: Ausschnittvergrößerung Abbildung 32 und Abbildung 33. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 100-fache Vergrößerung.

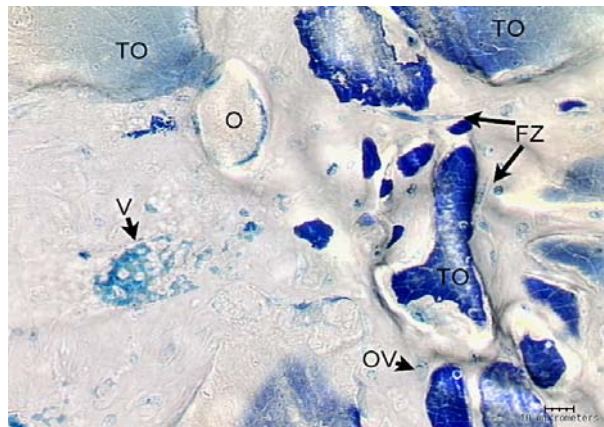


Abbildung 32: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 31. Lagerknochennaher Implantatbereich mit einsprossenden Blutgefäßen (V). Zellulärer Durchsetzung der kleinschollig zerfallenen, toluidinblau-gefärbten Ostim®-Paste (TO) mit ovalkernigen Zellen (OV), vereinzelt Fibrozyten (FZ). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 400-fache Vergrößerung.

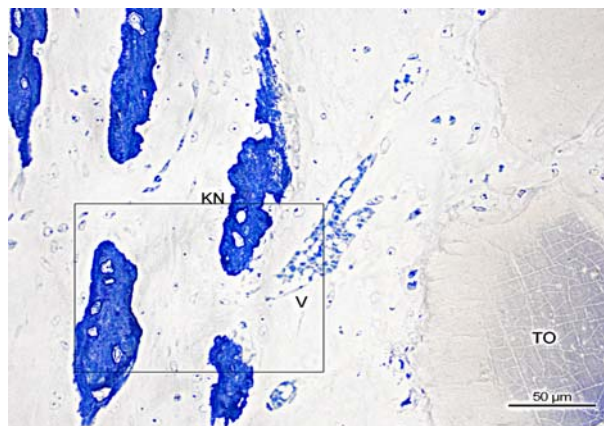


Abbildung 33: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 31. Lagerknochennahe Geflechtknochenneubildung (KN) und vaskuläre Erschließung (V) des Implantates (TO). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

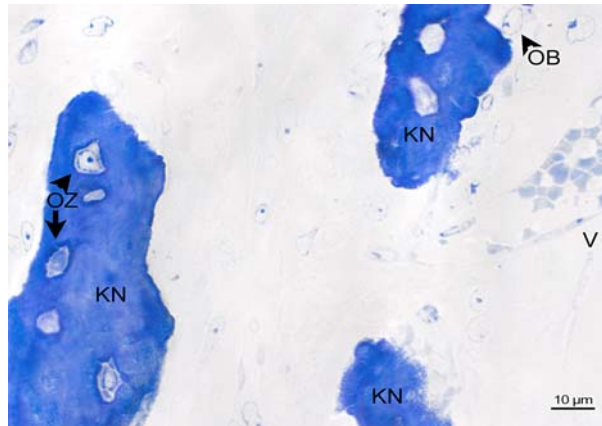


Abbildung 34: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 33. Geflechtknochenneubildung (KN) mit Osteoblasten (OB) und Osteozyten (OZ). V=Blutgefäß. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

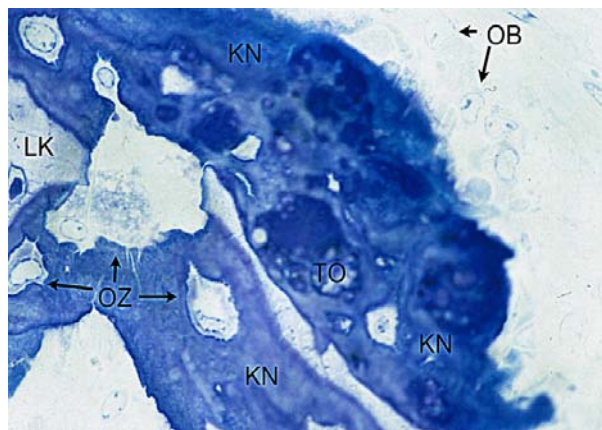


Abbildung 35: Knochenneubildung (KN) aus der Epiphysenregion mit Integration von toluidinegefärbten Ostim®-Resten (TO) durch Osteoblasten (OB). Direkter Verbund mit Lagerknochen (LK). OZ=Osteozyten bzw. sich einmauernde Osteoblasten. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

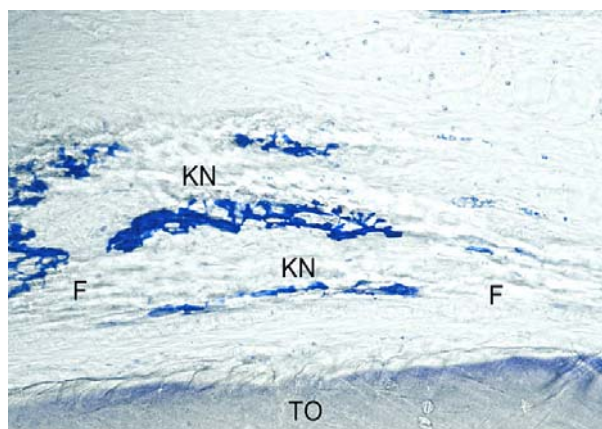


Abbildung 36: Region zwischen Femurdiaphyse (nicht im Bild) und Ostim®-gefülltem Markraum. Das Implantat (TO) weist zu den angrenzenden Geflechtknochenneubildungen (KN) hin eine zunehmende Toluidinfärbung auf. F=nicht gefärbte Kollagenfasern, die aus den Geflechtknochenneubildungen in die Umgebung ziehen. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 200-fache Vergrößerung.

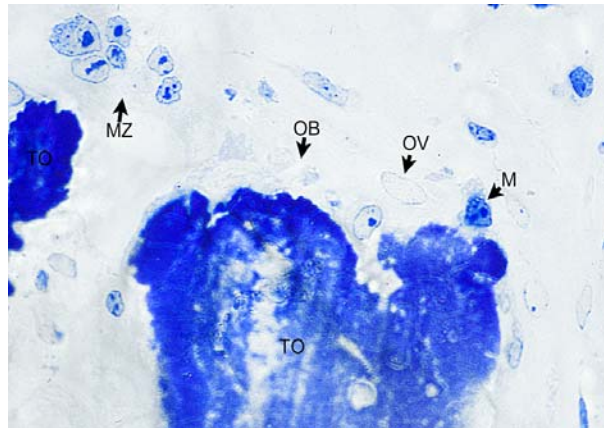


Abbildung 37: Ventrale Diaphysentrichterregion. toluidinegefärbtes Ostim® (TO) mit aufliegendem Osteoblasten/-layer (OB) und Makrophagen (M). Mehrkernige Zelle (MZ). Ovalkernige Zellen (OV). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

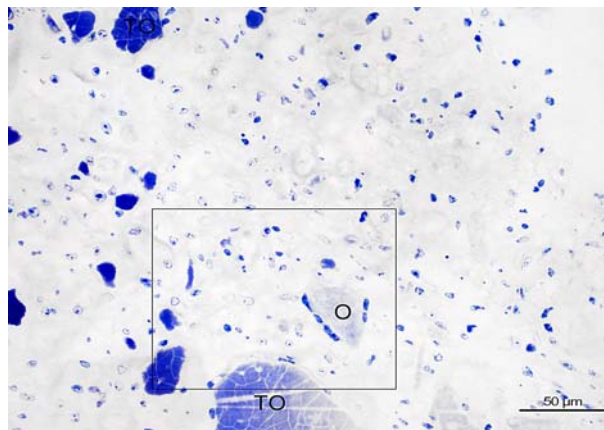


Abbildung 38: Periphere Implantatanteile im Diaphysentrichter. Granuläre bis schollige Auflockerung des Ostim® (O/TO) mit zellulärer Durchsetzung. Teilweise ist das Implantat toluidinegefärbt (TO). Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 39. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

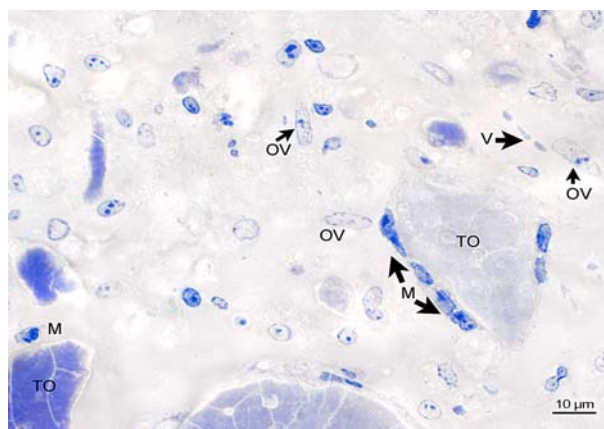


Abbildung 39: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 38. Kapilläre Erschließung (V) des granulär-schollig zerfallenen Implantates (TO). Zelluläre Durchsetzung mit Makrophagen (M), die Ostim® zum Teil direkt anlagern, sowie ovalkernigen Zellen (OV). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.



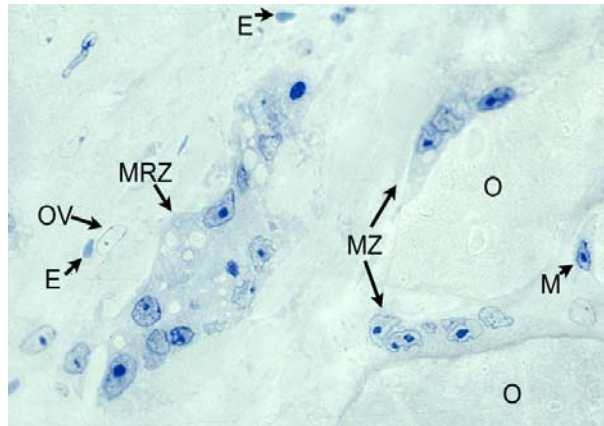


Abbildung 40: Übergangsregion zwischen peripheren und zentralen Implantatbereichen im Bereich des Diaphysentrichters. Das Implantat ist lagerknochennah (linke Bildhälfte) nicht klar abzugrenzen, zum zentralen Markraum hin (rechte Bildhälfte) liegen noch Ostim®-Schollen (O). Diesen sind zwei mehrkernige Zellen (MZ) und ein Makrophage direkt aufgelagert. Zwischen stark aufgelockertem Ostim® liegende mehrkernige Riesenzelle (MRZ) vom ungeordneten Typ. Vereinzelt ovale kernige Zellen (OV) und Erythrozyten (E). Kein Nachweis von Bindegewebe. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

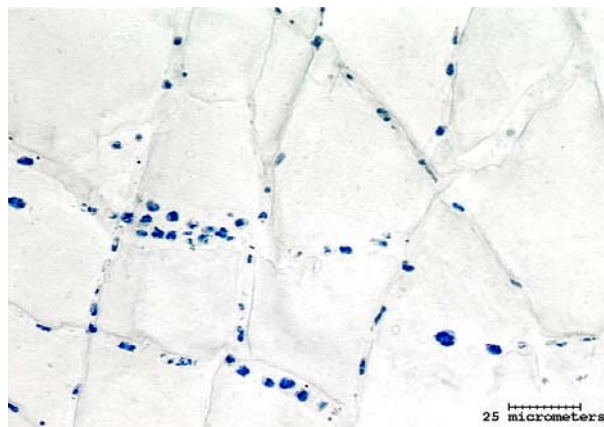


Abbildung 41: Von Zellstraßen durchzogene Ostim®-Paste des peripheren diaphysären Markraumes. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

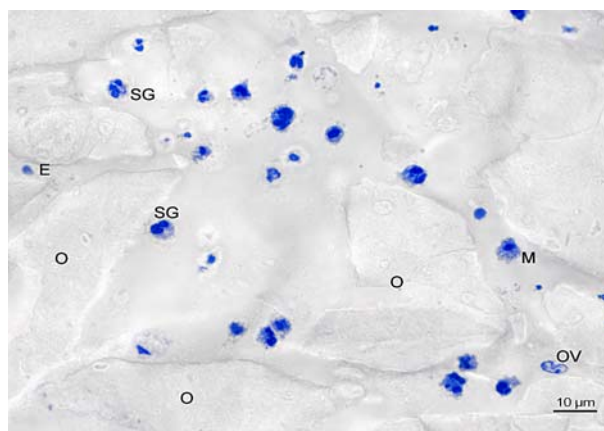


Abbildung 42: Aufgelockertes, schollig zerfallenes, nicht gefärbtes Ostim® aus dem Übergangsbereich von zentralem zu peripherem Implantat. Durchsetzung mit Makrophagen (M), segmentkernigen Granulozyten (SG), ovale kernigen Zellen (OV) und einzelnen Erythrozyten (E). Keine Ausbildung von Bindegewebe. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

#### **IV.3.1.3. Gruppe 2 (Ostim® - Vier Wochen postoperativ)**

Vier Wochen postoperativ waren bei allen vier Tieren rege lagerknochenständige Geflechtknochenneubildungen zu beobachten. Eine vollständige knöcherne Integration der Knorpel-Knochen-Deckel zeigten zwei Tiere. Der ca. 4,5 mm durchmessende metaphysäre Fräsdefekt war in zwei Fällen fast vollständig knöchern durchbaut (s. Abbildung 43 und Abbildung 44 bis Abbildung 50).

Diaphysär wiesen drei von vier Tieren eine distal betonte, endostale, trabekuläre Geflechtknochenneubildung auf, die bis maximal ca. 1,5 mm in den Markraum hineinragte (s. Abbildung 53 und Abbildung 54).

Die neugebildeten Knochenbälkchen waren lagerknochennah hellblau gefärbt, lamellär strukturiert sowie von Osteoidsäumen und Osteoblastenlayern umgeben (s. Abbildung 45 bis Abbildung 48). Vereinzelt zeigten sich Osteoklasten mit Howship'schen Lakunen als Zeichen eines stattfindenden Remodellings (s. Abbildung 50 und Abbildung 51). Die defektständigen Trabekel imponierten tiefblau gefärbt, osteozytenreich und weniger kompakt. Teilweise wurden Ostim®-Stücke formschlüssig und mit direktem Kontakt in die Knochentrabekel integriert (s. Abbildung 54 und Abbildung 57 bis Abbildung 60).

Intertrabekulär fanden sich Osteoblasten, ovalkernige Zellen, Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen vom ungeordneten Typ, Blutgefäße und Granulozyten (s. Abbildung 47 bis Abbildung 52). Aus den Knochentrabekeln zog eine ungefärbte Fasermatrix mit parallel orientierten Fasern und eingestreuten ovalkernigen Zellen in die Umgebung (Abbildung 55 und Abbildung 56).

Die Prüfsubstanz war epi- und metaphysär bis auf wenige tiefblau gefärbte Ostim®-Stücke abgebaut (s. Abbildung 43 bis Abbildung 45). Die Implantatreste verfügten über angelagerte Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen, Osteoblasten und vereinzelt Osteoblastenlayer mit Osteoidsäumen (s. Abbildung 49, Abbildung 52 und Abbildung 57 bis Abbildung 64). Der diaphysäre Markraum enthielt überwiegend grobschollig zerfallenes Ostim® mit eingewanderten Makrophagen, mäßig vielen mehrkernigen Riesenzellen vom ungeordneten Typ, segmentkernigen Granulozyten,

ovalkernigen Zellen und Erythrozyten (s. Abbildung 43, Abbildung 53, Abbildung 54 und Abbildung 62 bis Abbildung 64). Zur Kortikalis hin war das Implantat zunehmend aufgelockert und zellulär durchsetzt.

Endostale diaphysäre Geflechtknochenneubildungen integrierten größere Ostim®-Schollen formschlüssig mit direktem Kontakt (s. Abbildung 53 und Abbildung 54). Das Implantat wies hier eine intensive Toluidinfärbung auf (s. Abbildung 59). Osteogenetisch inaktive Areale enthielten dagegen ungefärbtes Ostim®. Eine bindegewebige Reaktion war nicht zu beobachten.

Zwei Tiere wiesen im distalen Diaphysendrittel eine verstärkte periostale Knochenneubildung auf. Die übrigen Lagerknochenanteile und das Knochenmark stellten sich unauffällig dar. Es fand sich insbesondere keine inflammatorische oder fibrosierende Reaktion.

#### **IV.3.1.4. Bilddokumentation – Helfeldmikroskopie Gruppe 2** **(Ostim® - Vier Wochen postoperativ)**

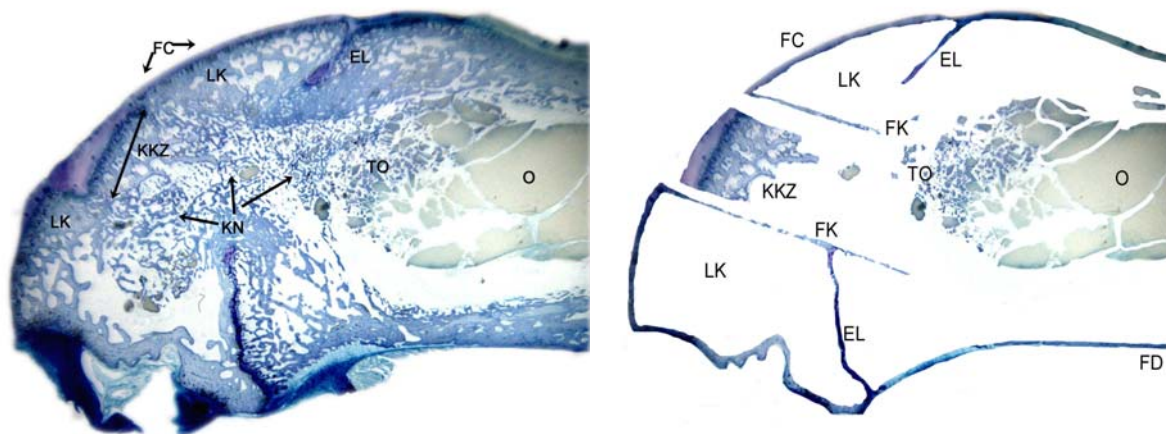


Abbildung 43 (links): Vollständig knöchern integrierter Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ). Rege Knochenneubildung (KN) im metaphysären Implantationskanal. Epi- und metaphysär fortgeschrittener Ostim®-Abbau. Diaphysärer Markraum mit grobscholligem Implantatmaterial (O). toluidinegefärbtes Ostim® (TO) in osteogenetisch aktiven Zonen. LK=Lagerknochen, FC=Femurkondyle, EL=Epiphysenlinie. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. Sechsfache Vergrößerung.  
 Rechts schematische Darstellung mit „entfernter“ Lagerknochenspongiosa sowie Knochenneubildungen.

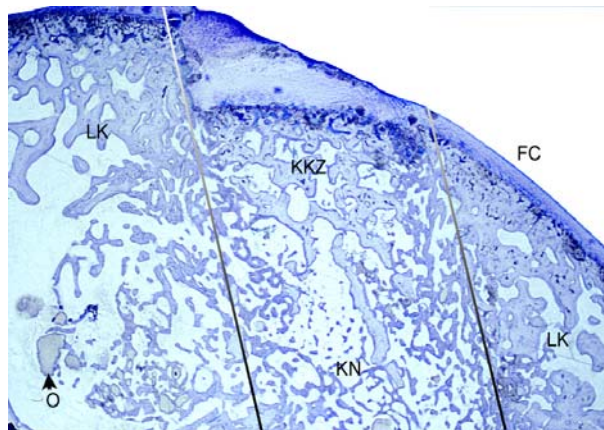


Abbildung 44: Ausschnittvergrößerung aus der Epiphysenregion von Abbildung 43. Vollständig knöchern integrierter Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) und knöchern durchbauter metaphysärer Implantationskanal (KN). Weitestgehend abgebautes Implantatmaterial, nur vereinzelt Nachweis von Ostim®-Schollen (O). Linien=Verlauf der ehemaligen Fräskanten. LK=Lagerknochen. FC=Femurkondyle. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 12,5-fache Vergrößerung.

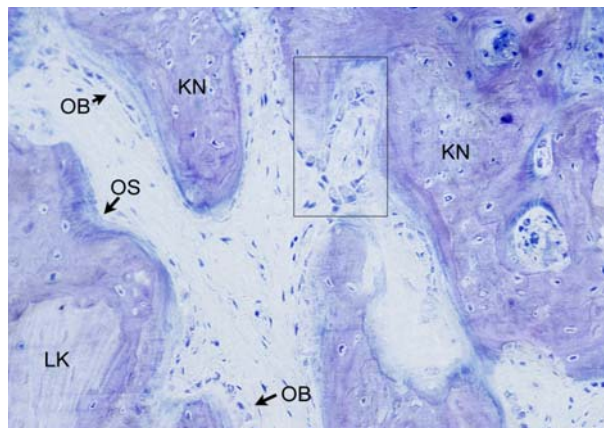


Abbildung 45: Rege Knochenneubildung (KN) aus dem vollständig durchbauten dorsalen Spaltraum (zwischen Knorpel-Knochen-Zylinder und Lagerknochen (LK)). Multiple Osteoblastenlayer (OB) mit korrespondierenden Osteoidsäumen (OS). Rahmen: s. Abbildung 46. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 200-fache Vergrößerung.

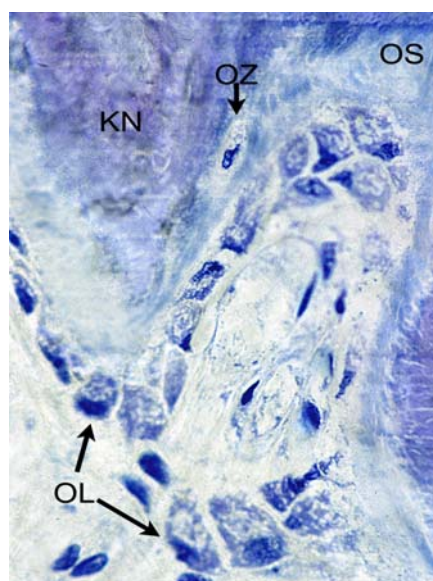


Abbildung 46: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 45.

Knochenneubildung mit angelagerten Osteoblasten-layer (OL) und Osteoidsäumen (OS). OZ=sich einmauernder Osteoblast/Osteozyt.

Implantat: Ostim®

Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.  
1000-fache Vergrößerung.



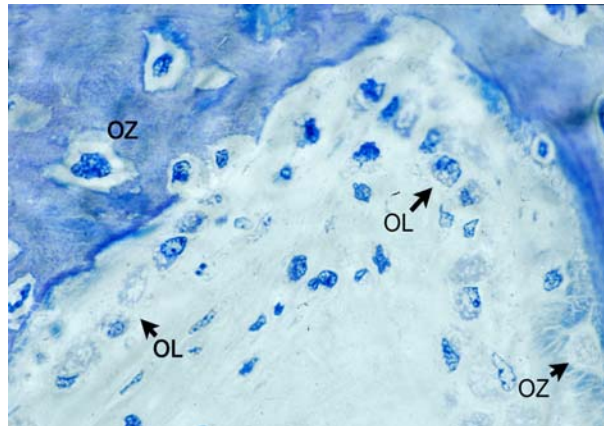


Abbildung 47: Appositionelle Knochenneubildung/Osteoidproduktion durch stoffwechselaktive, kuboid geformte Osteoblasten/Osteoblastenlayer (OL). OZ=Osteozyten. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

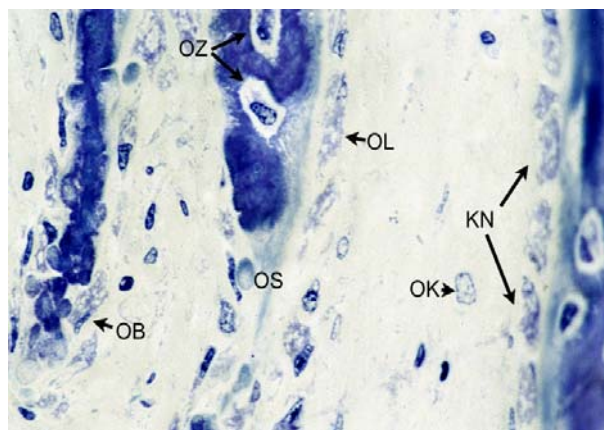


Abbildung 48: Unterschiedliche Stadien der Knochenneubildung. Links im Bild ungerichtete Geflechtknochenneubildung durch Osteoblasten (OB). Mittig und rechts im Bild Osteoblastenlayer (OL) mit gerichteter Osteoidproduktion (OS). OZ=Osteozyten. OV=ovalkernige Zelle. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

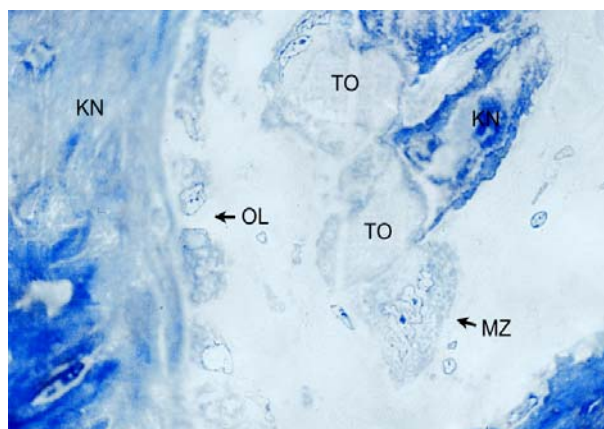


Abbildung 49: Implantatreste (TO/O) mit angelagerter mehrkerniger Zelle (MZ) sowie Knochenneubildung (KN) mit direktem Kontakt. Gegenüberliegende Knochenneubildung mit Osteoblastenlayer (OL). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

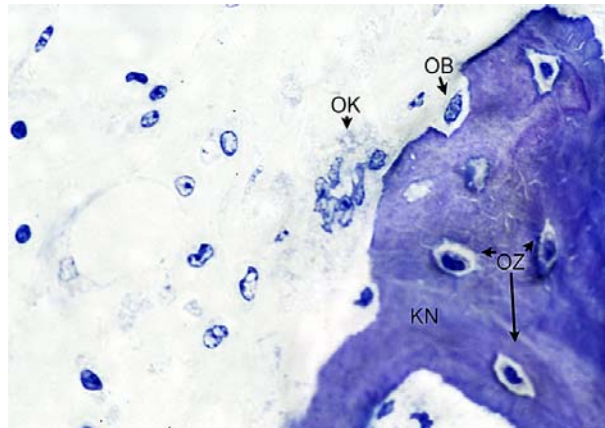


Abbildung 50: Mehrkerniger Osteoklast (OK) angelagert an Geflechtknochenneubildung (KN) als Zeichen eines stattfindenden Remodelling. Mehrere Osteozyten (OZ). Sich einmauernder Osteoblast (OB). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

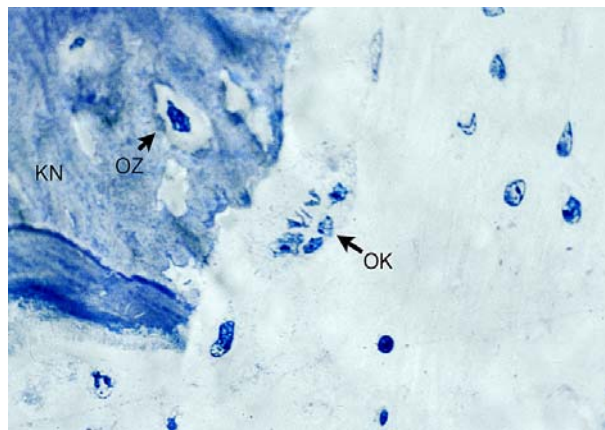


Abbildung 51: Dorsaler Spaltraum zwischen Knorpel-Knochenzylinder und Lagerknochen: An Knochenneubildungen (KN) angelagerter mehrkerniger Osteoklast (OK) mit unregelmäßig begrenztem Zytoplasma zum Knochen hin. OZ=Osteozyt. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

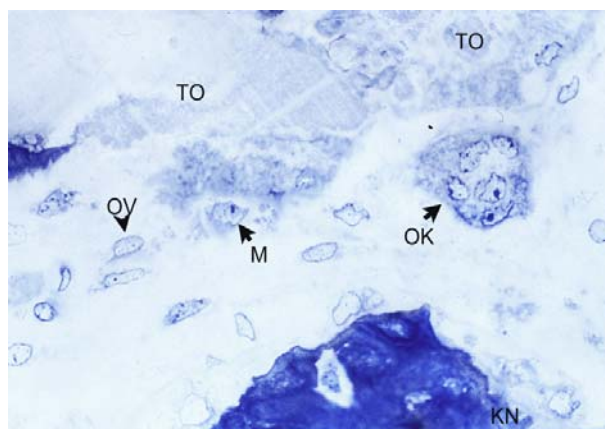


Abbildung 52: Dorsaler Spaltraum: An Implant (TO) angelagerter Makrophage (M) und mehrkerniger Osteoklast (OK) mit unregelmäßig gestalteter Zytoplasmagrenze zum Ostim® hin (ruffled border). KN=Knochenneubildung mit Osteoblasten und Osteozyten. OV=Ovalkernige Zelle. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

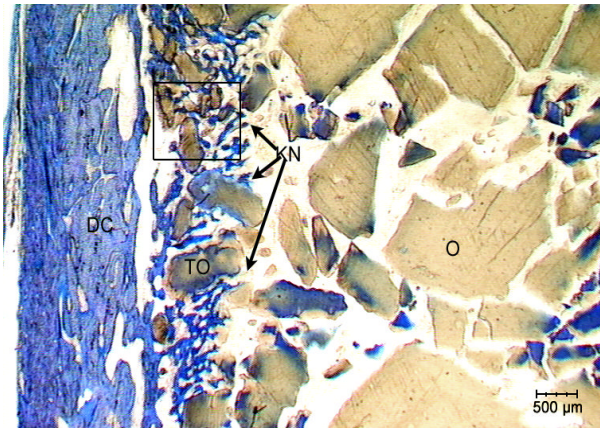


Abbildung 53: Diaphysäre Geflechtknochenneubildungen (KN) mit formschlüssiger Integration toluidinegefärbter Ostim®-Stücke (TO). Im zentralen Markraum größere ungefärbte Ostim®-Schollen (O). DC=diaphysäre Kortikalis. Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 54. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 12,5-fache Vergrößerung.

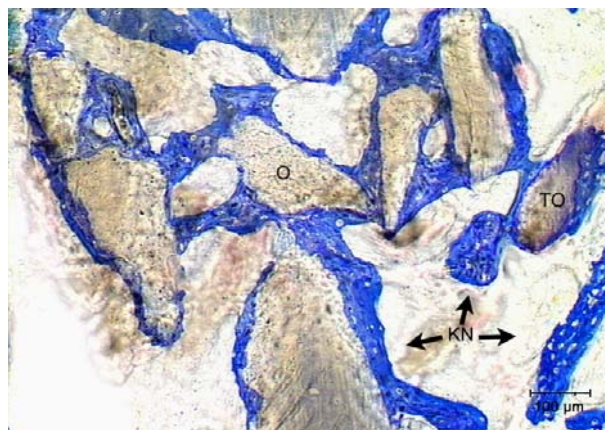


Abbildung 54: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 53. Ostim® teils toluidinegefärbt (O/TO) mit bindegewebsfreiem Kontakt zu neugebildeten Geflechtknochen trabekeln (KN). Leitschiene funktion der Ostim®-Schollen im Sinne einer Osteokonduktion. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

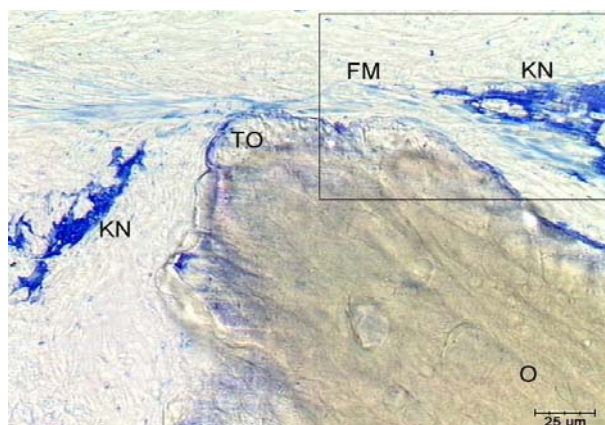


Abbildung 55: Femurale Diaphysenregion: Implantatnahe Geflechtknochenneubildung (KN) mit Fasermatrix (FM), welche in neu gebildete Geflechtknochen trabekel übergeht. Toluidinfärbung des Implantates (O) betont im den osteogen aktiven Bereichen (TO). Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 56. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.



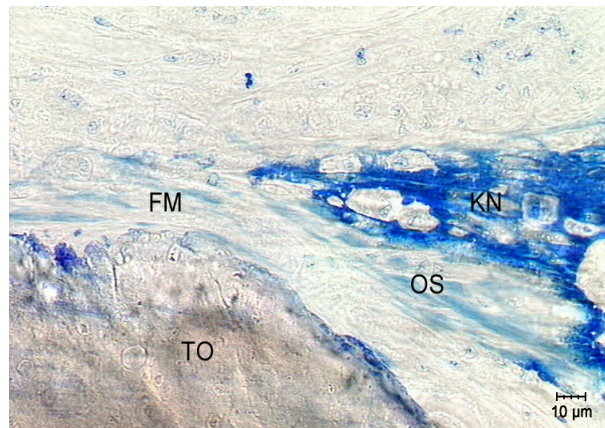


Abbildung 56: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 55. Implantatnahe (TO) Geflechtknochenneubildung (KN) mit umgebender Fasermatrix (FM). Im Bereich der osteogen aktiven Zone ist die Fasermatrix mit Osteoid (OS) durchsetzt; - dies verliert sich im Verlauf. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

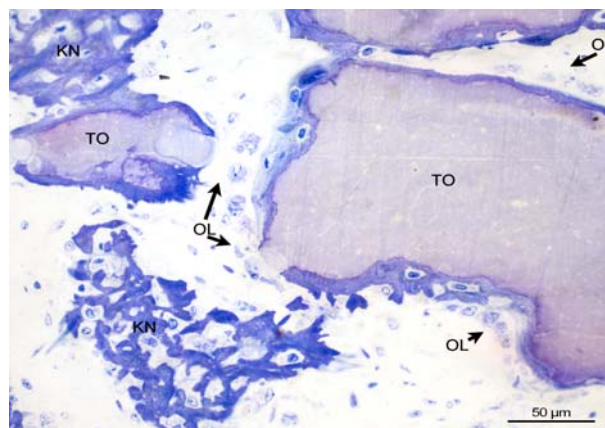


Abbildung 57: Rege Knochenneubildung (KN) mit Ostim®-angelagerten Osteoblastenlayern (OL) und Toluidinfärbung des Implantates (TO). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

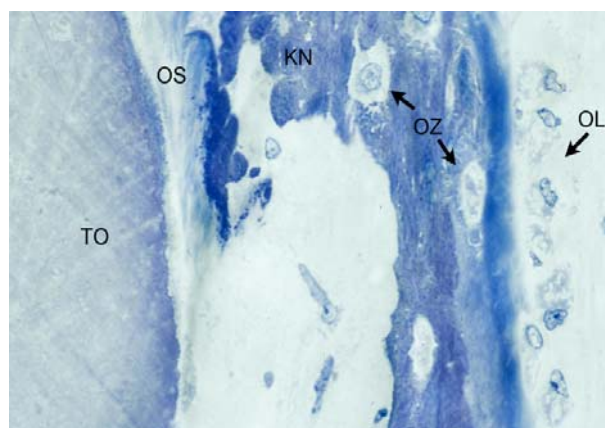


Abbildung 58: Toluidingefärbtes Implantat aus der peripheren Implantatregion des Diaphysentrichters. Aufgelagertes Osteoid (OS) und Geflechtknochen (KN). OL=Osteoblastenlayer, OZ=Osteozyten. Das Ostim® weist zu der osteogen aktiven Zone eine zunehmend stärkere Toluidinfärbung auf. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.



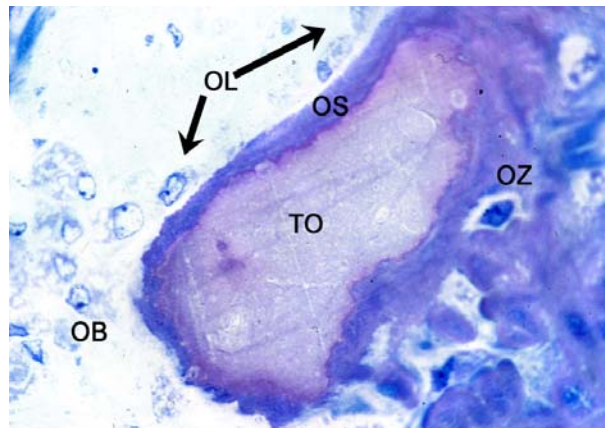


Abbildung 59: Direkte osteoblastäre Knochenapposition auf toluidingefärbtes Ostim® (TO). OB=Osteoblasten. OL=Osteoblastenlayer. OS=Osteoidsaum. OZ=Osteozyt. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

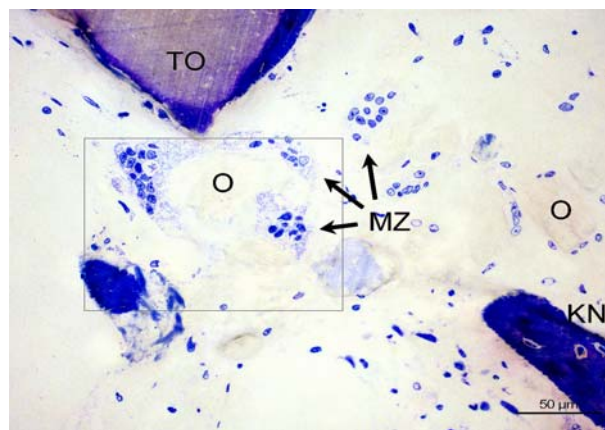


Abbildung 60: Zentraler metaphysärer Implantationskanal: Zahlreiche mehrkernige Riesenzellen (MZ), die Implantatstücke umgeben. Ostim® mit aufgelagertem Osteoid weist in den Randbereichen eine zunehmende Toluidinfärbung auf (TO). KN=Knochenneubildung. Rahmen: Ausschnittvergrößerung Abbildung 61. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

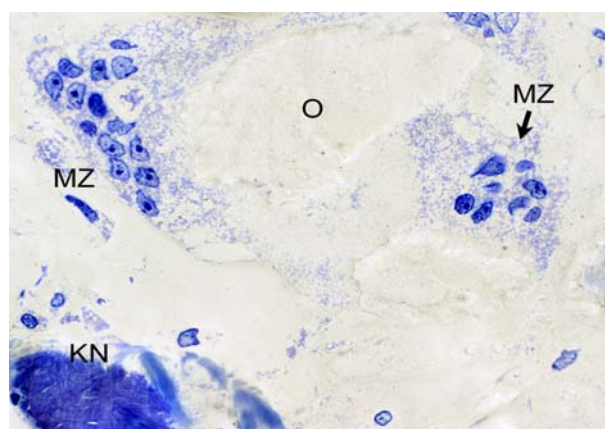


Abbildung 61: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 60. Von mehrkernigen Riesenzellen (MZ) nahezu umgebenes Ostim®-Stück (O). KN=Knochenneubildung. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

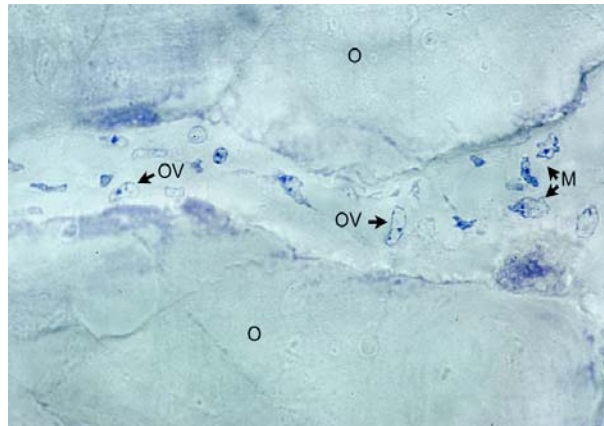


Abbildung 62: Zentraler diaphysärer Markraum. Einwandern von Zellen zwischen zwei größere Ostim®-Schollen (O). M=Makrophagen. OV=Ovalkernige Zellen. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

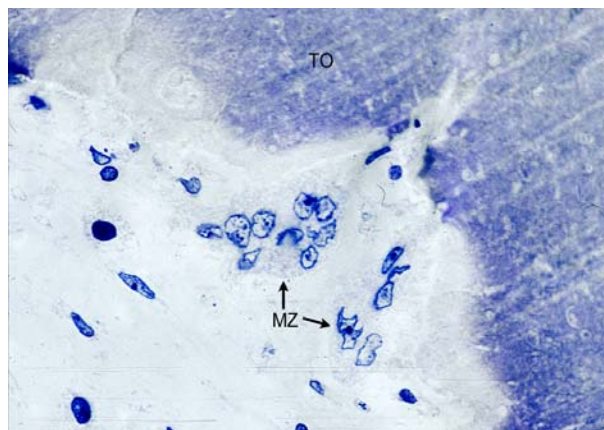


Abbildung 63: Zentraler diaphysärer Markraum. Kompakte toluidinegefärbte Implantatmassen (TO) mit aufliegenden mehrkernigen Zellen. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

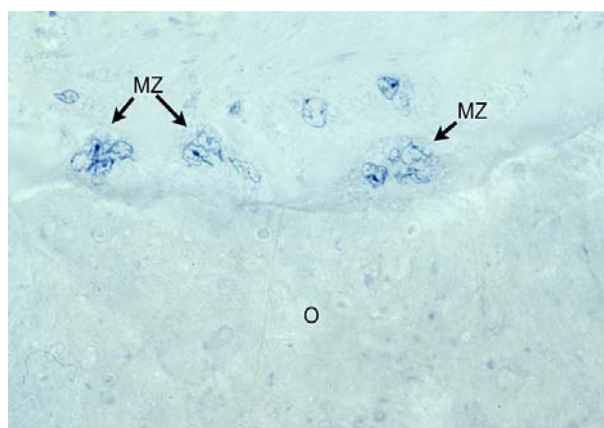


Abbildung 64: Kompakte Implantatmassen des diaphysären Markraumes (O) mit aufgelagerten mehrkernigen Zellen (MZ). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

### IV.3.2. Ostim<sup>®</sup> plus 10/20

Zwischen den Implantatgruppen mit 10 bzw. 20%-iger Clindamycinaktivität ergaben sich histologisch keine signifikanten Unterschiede, sodass diese Ergebnisse gemeinsam dargestellt werden.

#### **IV.3.2.1. Gruppe 3 (Ostim<sup>®</sup> plus - Zwei Wochen postoperativ)**

Zwei Wochen nach Implantation waren der Defektkanal und der diaphysäre Markraum größtenteils mit kompaktem grobgranulärem und zellfreiem Ostim<sup>®</sup> plus ausgefüllt (s. Abbildung 65, Abbildung 71 und Abbildung 79).

In den Spalträumen zwischen Knorpel-Knochen-Zylinder und Lagerknochen lag das Implantat aufgelockert vor und war von Makrophagen, Granulozyten, Erythrozyten und ovalkernigen Zellen durchsetzt. Vereinzelt fanden sich Blutgefäße. Mehrkernige Riesenzellen, Osteoblasten oder implantatdurchsetzende Zellstraßen konnten nicht beobachtet werden (s. Abbildung 66 bis Abbildung 68 und Abbildung 75 bis Abbildung 77).

Die replantierten Knorpel-Knochen-Zylinder lagen dem Implantat auf und waren im Implantationskanal maximal 2 mm unter das Gelenkniveau abgesunken (s. Abbildung 65).

Defektständige Knochenneubildungen hatten nicht stattgefunden. Die Fräskanten stellten sich überwiegend glatt dar und wiesen vereinzelt Knochenmehlaufagerungen auf (s. Abbildung 66 bis Abbildung 68 und Abbildung 71). Zwei Tiere zeigten geringgradige Geflechtknochenneubildungen in der epiphysären Spongiosa (s. Abbildung 69 und Abbildung 70). Ebenfalls bei zwei Tieren war eine beginnende Geflechtknochenneubildung an implantatangrenzenden Lagerknochen trabekeln der Metaphyse zu beobachten (s. Abbildung 71 bis Abbildung 74).

Im diaphysären Markraum grenzte das Ostim<sup>®</sup> plus überwiegend direkt an die diaphysäre Kortikalis oder vitales Knochenmark (s. Abbildung 78). Sehr vereinzelt

fand sich parallel strukturiertes Fasergewebe, das dem Implantat aufgelagert war. Dieses war nur umschrieben vorhanden; - abgegrenzte membranöse Struktur waren nicht ausgebildet. Im Diaphysentrichter eines Tieres erreichte dieses Fasergewebe eine maximale Dicke von ca. 200  $\mu\text{m}$  (s. Abbildung 80).

Die Prüfsubstanz war größtenteils ungefärbt, wies jedoch diffus eingestreute toluidin-gefärbte Ostim<sup>®</sup>-Globuli auf (s. Abbildung 65, Abbildung 69, Abbildung 71 und Abbildung 78 bis Abbildung 79). Eine Korrelation dieses Färbeverhaltens mit osteogenetischen Prozessen bestand nicht.

Der Wirtsknochen stellte sich vital dar.

#### **IV.3.2.2. Bilddokumentation – Hellfeldmikroskopie Gruppe 3** **(Ostim<sup>®</sup> plus – Vier Wochen postoperativ)**

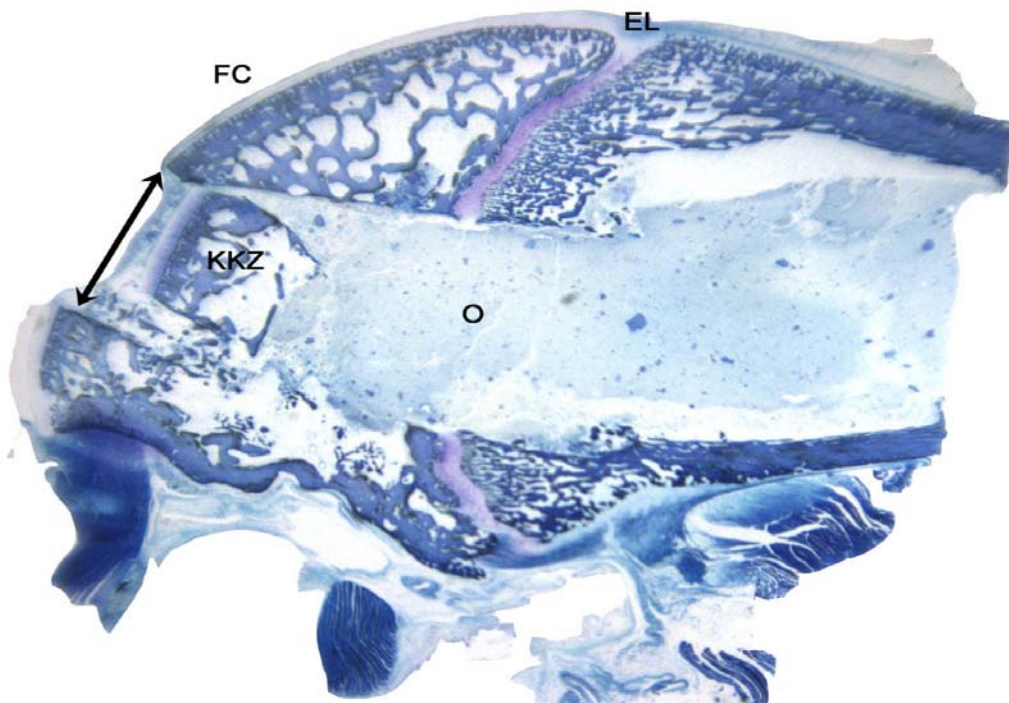


Abbildung 65: Der Fräskanal sowie der diaphysäre Markraum wird von weitestgehend kompaktem Ostim<sup>®</sup> plus (O) formschlüssig ausgefüllt. Das Implantat imponiert mit diffus eingestreuten toluidin-gefärbten Ostim<sup>®</sup>-Globuli. Der replantierte Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) ist geringfügig im Defekt abgesunken. FC=Femurcondyle. EL=Epiphysenlinie. Implantat: Ostim<sup>®</sup> plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. Sechsfache Vergrößerung.



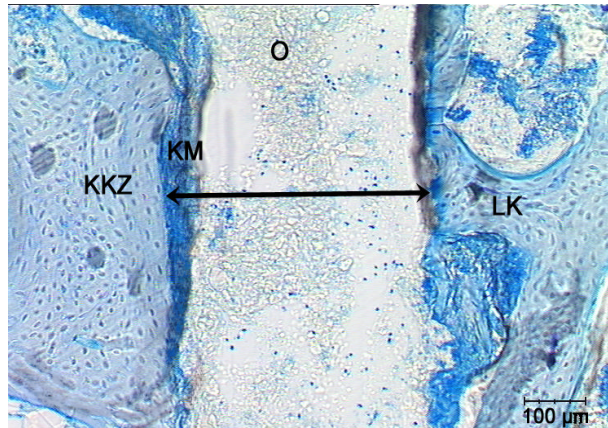


Abbildung 66: Ca. 400 µm messender Spaltraum zwischen replantiertem Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ) und epiphysärer Lagerknochenspongiosa (LK) mit zellulär durchsetztem und teilweise abgebautem Ostim® plus (O). Weitestgehend glatt begrenzte Fräskanten ohne Osteolysen mit Knochenmehlaufagerungen (KM). Knochenneubildungen sind nicht vorhanden. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

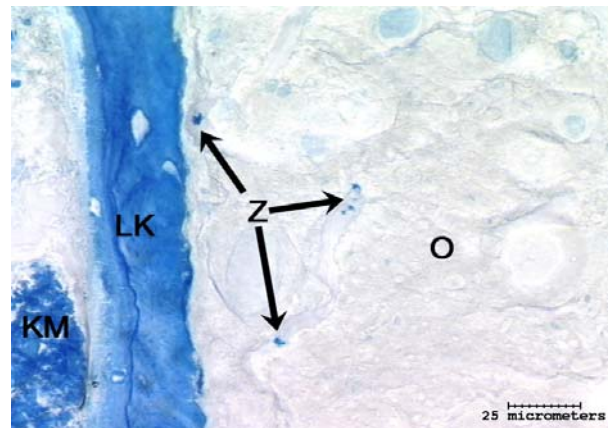


Abbildung 67: Glatte Fräskante des metaphysären Lagerknochens (LK) mit bindegewebsfreiem Ostim®-Kontakt. Kompakt-granuläres Implantat (O) mit beginnender zellulärer Erschließung (Z). KM=Knochenmehl. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

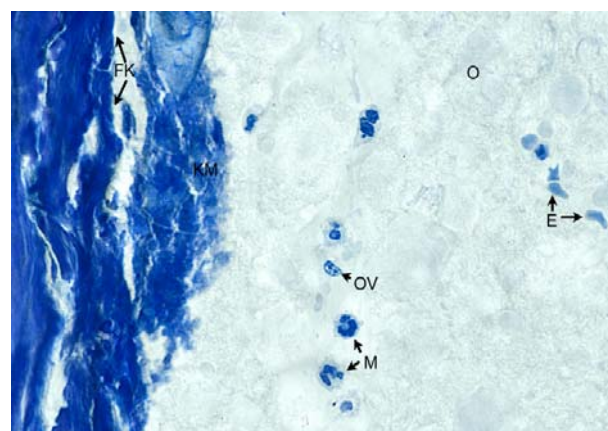


Abbildung 68: Dorsale metaphysäre Fräskante (FK) mit Knochenmehlaufagerungen (KM). Angrenzendes grob granuläres Implantat (O) zellulär durchsetzt mit Makrophagen (M), Erythrozyten (E) und ovalkernigen Zellen (OV). Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

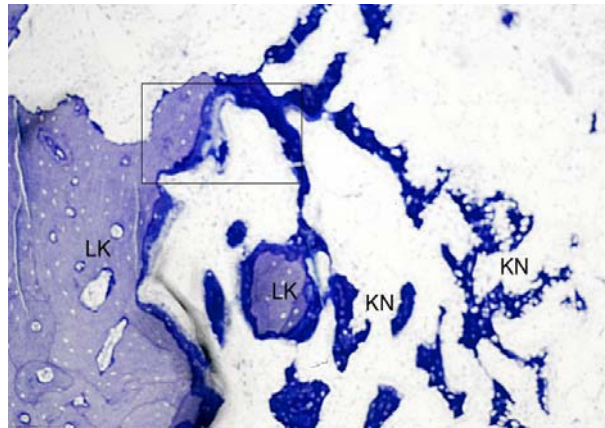


Abbildung 69: Defektfreier epiphysärer Lagerknochen (LK) mit zum Implantationskanal hin (rechts im Bild) angrenzender Geflechtknochenneubildung (KN). Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 70. Implantat: Ostim<sup>®</sup> plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 100-fache Vergrößerung.

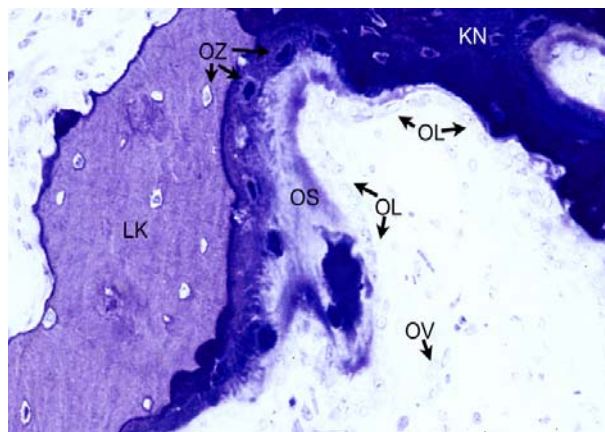


Abbildung 70: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 69. Defektfreier epiphysärer Lagerknochen (LK) mit aufgelagertem Osteoid (OS) und Osteoblastenlayern (OL). Intertrabekulär liegende ovale Zellen (OV). OZ=Osteozyten. KN=Geflechtknochenneubildung. Implantat: Ostim<sup>®</sup> plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 400-fache Vergrößerung.

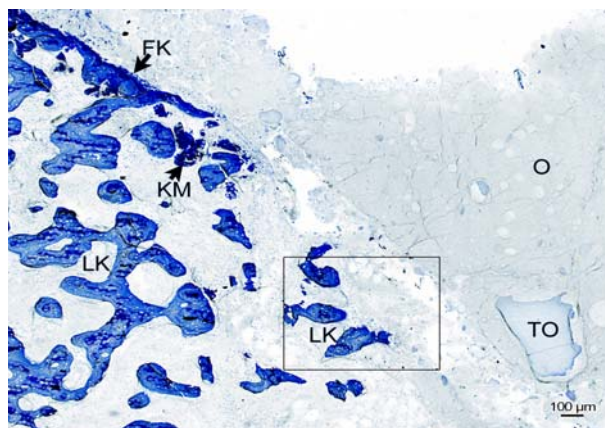


Abbildung 71: Proximales Ende der dorsalen Fräskante (FK) mit angrenzendem metaphysärem Implantationskanal. Beginnender Abbau des Implantates, welches zum Teil toluidinegefärbt ist (TO). LK=Metaphysärer Lagerknochen. Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 72. Implantat: Ostim<sup>®</sup> plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

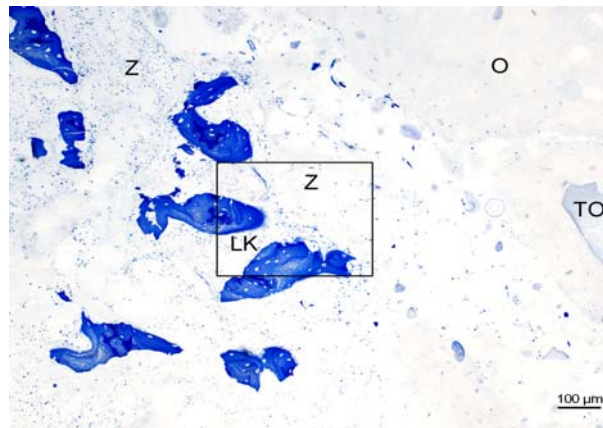


Abbildung 72: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 71. „Angeschnittene“ metaphysäre Lagerknochentrabekel (LK) mit zellulärer Durchsetzung (Z) der intertrabekulären Räume. Im Implantationskanal peripher aufgelockertes und teilweise abgebautes Ostim® – zentral kompakte Implantatmassen (O/TO). Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 73. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

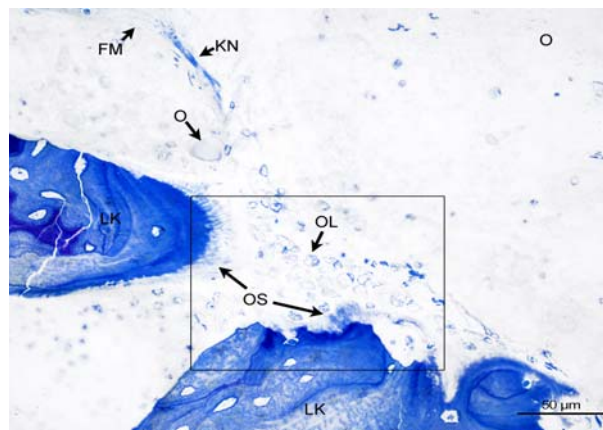


Abbildung 73: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 72 Beginnende Knochenneubildung. Einerseits als Geflechtknochenneubildung mit ausstrahlender Fasermatrix im metaphysären Implantationskanal lagerknochennah; - andererseits als Osteoidablagerung (OS) auf vorhandene Lagerknochentrabekel (LK) durch Osteoblastenlayer (OL). Das Implantat ist feingranulär zerfallen (O) oder abgebaut. Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

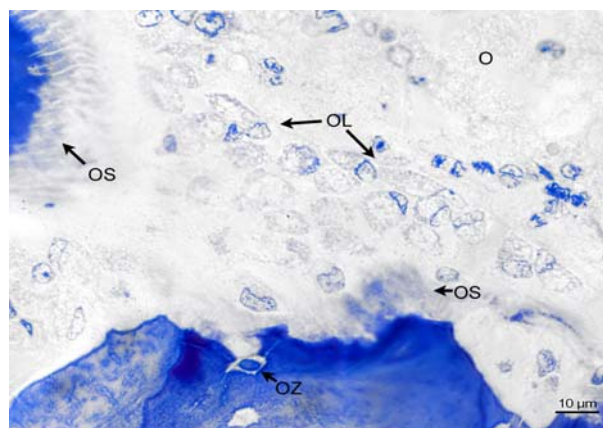


Abbildung 74: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 73. Osteoid (OS)-sezernierende Osteoblastenlayer (OL) auf Lagerknochentrabekel der Metaphyse. Feingranulär vorliegendes ungefärbtes Implantat (O). Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.



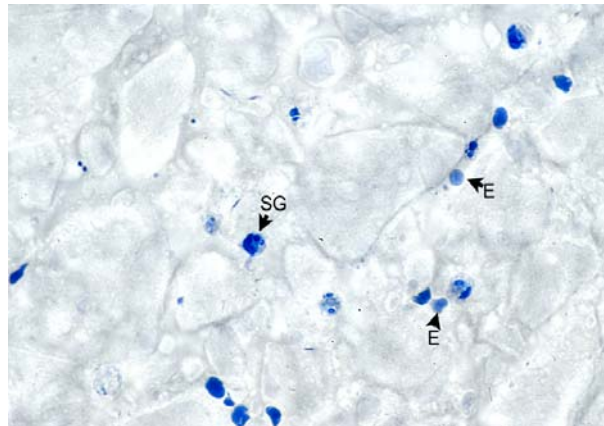


Abbildung 75: Zylinder-Lager-Spaltraum gefüllt mit grob granulärem Ostim<sup>®</sup> plus und eingewanderten Zellen. E=Erythrozyten. Segmentkerniger Granulozyt (SG). Implantat: Ostim<sup>®</sup> plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

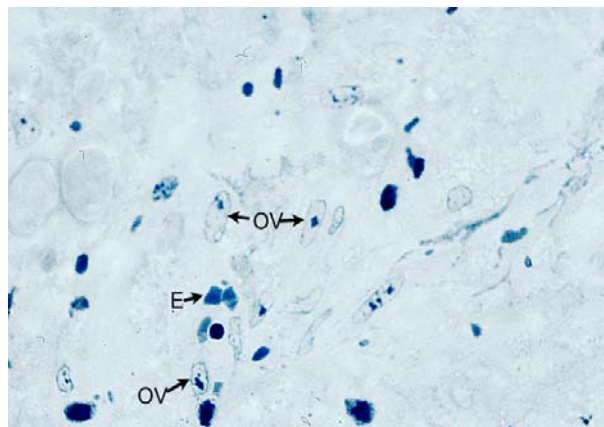


Abbildung 76: Zylinder-Lager-Spaltraum gefüllt mit grob granulärem Implantat und eingewanderten ovale kernigen Zellen (OV) und Erythrozyten (E). Implantat: Ostim<sup>®</sup> plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

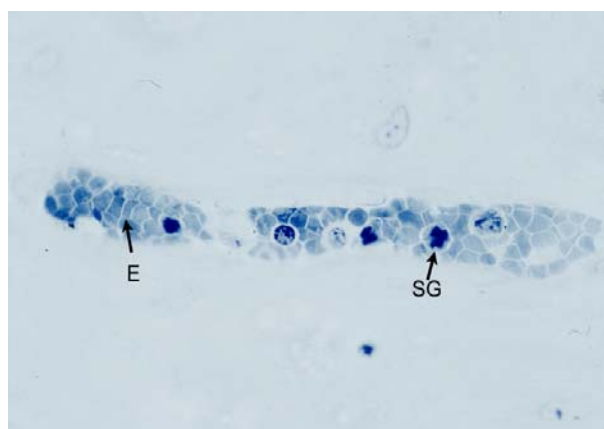


Abbildung 77: Vaskularisation im dorsalen Zylinder-Lager-Spaltraum. E=Erythrozyten. SG=Segmentkerniger Granulozyt. Übrige Zellen nicht sicher differenzierbar. Implantat: Ostim<sup>®</sup> plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.



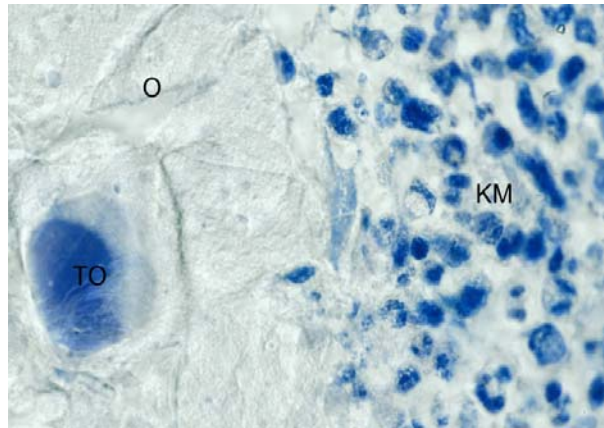


Abbildung 78: Kompaktes zellfreies Implantat (O) mit fokaler Toluidinfärbung (TO) aus der Diaphysenregion mit direkt angrenzendem zellreichem Knochenmark (KM). Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

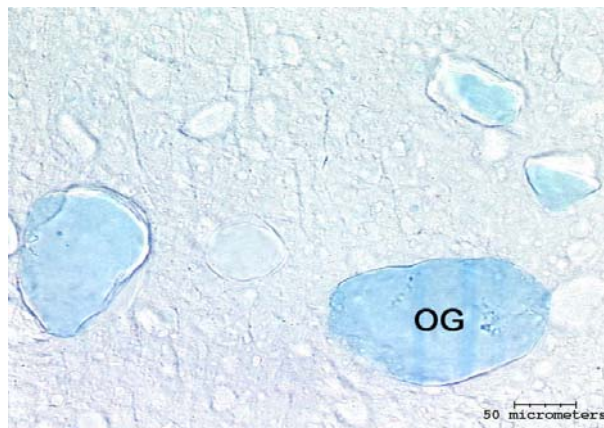


Abbildung 79: Zentraler diaphysärer Markraum mit kompakt-granulärem zellfreiem Ostim® plus. Größtenteils ungefärbtes Implantat mit diffus eingestreuten toluidinegefärbten Ostim®-Globuli (OG). Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen.

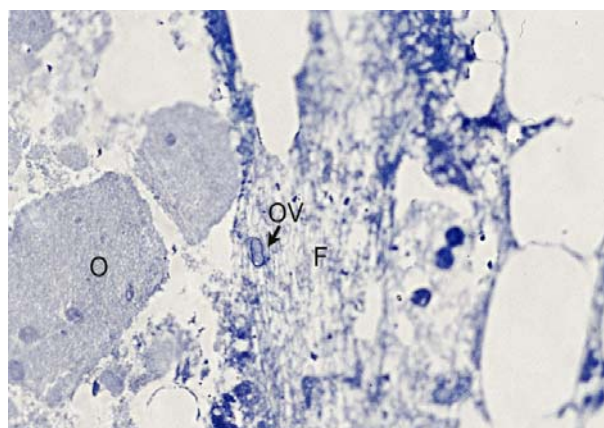


Abbildung 80: Diaphysentrichter mit vermehrter bindegewebiger Fasermatrix, die dem Ostim® plus (O) aufgelagert ist (lediglich bei einem Tier in dieser Stärke (ca. 200 µm) ausgebildet). OV=Ovalkernige Zelle. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 400-fache Vergrößerung.

#### **IV.3.2.3. Gruppe 4 (Ostim® plus - Vier Wochen postoperativ)**

Nach vierwöchiger Implantation von Ostim® plus füllte die Prüfsubstanz noch große Teile des Defektkanals und des diaphysären Markraumes aus (s. Abbildung 81 und Abbildung 82).

Epiphysär und peripher metaphysär lag sie kleinschollig bis grobgranulär zerfallen vor und war von zahlreichen Blutgefäßen und Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen vom ungeordneten Typ, ovalkernigen Zellen sowie segmentkernigen Granulozyten durchsetzt (s. Abbildung 88 bis Abbildung 90, Abbildung 94 und Abbildung 95).

Zentrale metaphysäre und diaphysäre Bereiche enthielten eine kompakte Implantatmasse, die von Zellstraßen aus Makrophagen, Erythrozyten und vereinzelt Granulozyten durchsetzt war (s. Abbildung 96).

Lagerknochenständige Knochenneubildungen konnten insbesondere epi- und metaphysär beobachtet werden (s. Abbildung 82 bis Abbildung 92 und Abbildung 93). Diese waren tiefblau gefärbt, osteozytenreich und von zahlreichen Gefäßen, mäßig vielen Osteoblasten, Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen, wenigen Osteoklasten und Granulozyten umgeben (s. Abbildung 90 bis Abbildung 93). Einzelne Implantatstücke wurden formschlüssig und mit direktem Kontakt integriert (s. Abbildung 84 bis Abbildung 86). Neu gebildeter Geflechtknochen ging in eine ungefärbte Fasermatrix über (s. Abbildung 90).

Der Knorpel-Knochen-Zylinder heilte bei zwei von fünf Tieren vollständig knöchern ein. In einem Fall war der Zylinder ca. 3 mm im Implantationskanal abgesunken und der Defekt gelenkflächennah knöchern überbrückt (s. Abbildung 87). Metaphysäre Neoossifikationen der Fräskanten waren bei drei Tieren ausgebildet.

Die diaphysäre Kortikalis stellte sich überwiegend glatt und mit direktem Implantatkontakt dar. Das diaphysäre Endost eines Tieres wies Geflechtknochenneubildungen auf, die bis ca. 500 µm weit in den Markraum hineinragten.

In osteogenetisch aktiven Bereichen wies Ostim® plus eine tiefblaue Toluidinfärbung auf (s. Abbildung 82 bis Abbildung 86 und Abbildung 88). Ansonsten kam es überwiegend ungefärbt, mit diffus eingelagerten hellblauen Ostim®-Globuli zur Darstellung (s. Abbildung 88 und Abbildung 94 bis Abbildung 97).

Der Wirtsknochen war vital.

#### **IV.3.2.4. Bilddokumentation – Hellfeldmikroskopie Gruppe 4** **(Ostim® plus – Vier Wochen postoperativ)**

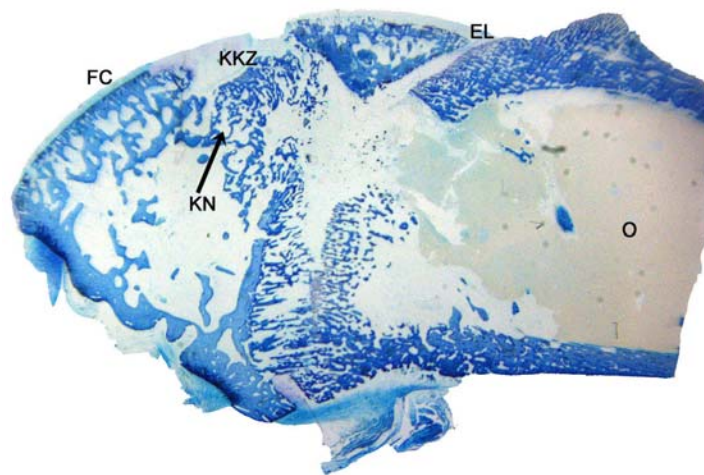


Abbildung 81: Teilweise knöchern integrierter Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ). Epiphysär größtenteils abgebautes Ostim® plus. Metaphysär aufgelockertes teils abgebautes Implantatmaterial. Diaphysär kompakte, ungefärbte Implantatmasse (O). KN=Knochenneubildung, FC=Femurkondyle, EL=Epiphysenlinie. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. Sechsfache Vergrößerung.

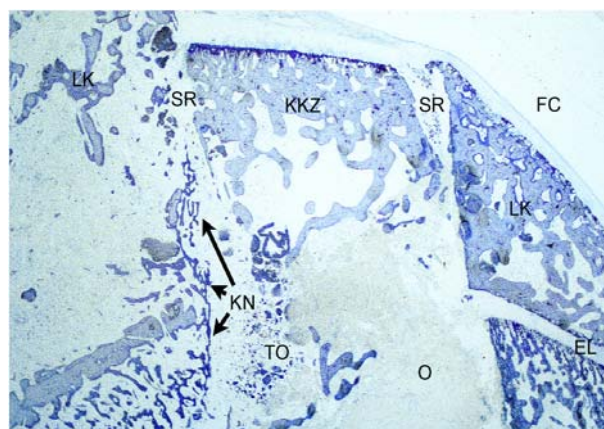


Abbildung 82: Im Vergleich mit Abbildung 81 geringere Knochenneubildung. Nur geringe Knochenneubildung (KN) am proximalen dorsalen Spaltraum (SR). Im Bereich der osteogen aktiven Zone ist das Implantat toluidinegefärbt (TO), sonst weitestgehend ungefärbtes Ostim® plus (O). FC=Femurkondyle. KKZ=Knorpel-Knochen-Zylinder. EL=Epiphysenlinie. LK=Lagerknochen. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 12,5-fache Vergrößerung.



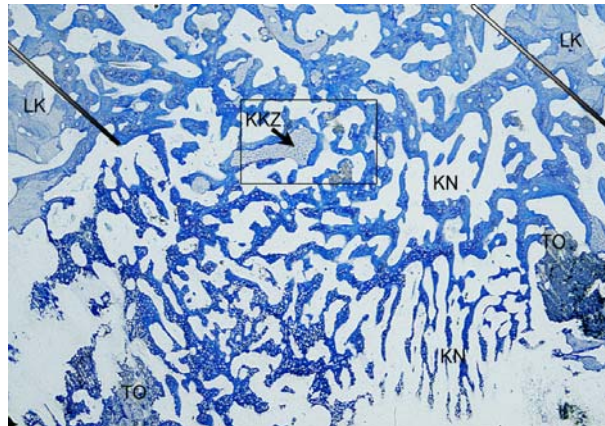


Abbildung 83: Metaphysärer Implantationskanal (Linien = ehemalige Fräskanten). Trabekuläre Knochenneubildungen (KN) mit Integration von wenigen noch vorhandenen toluidingefärbten Ostim®-Resten (TO). KKZ=proximaler Knochentrabekel des Knorpel-Knochenzylinders. LK=Lagerknochen. Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 84. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 25-fache Vergrößerung.

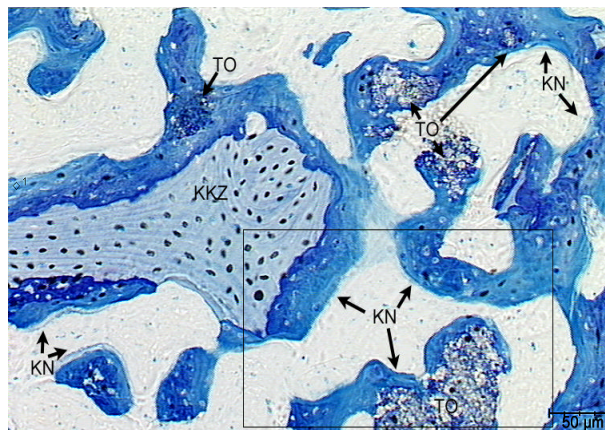


Abbildung 84: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 83. Knöcherne Integration eines proximalen Zylindertrabekels (KKZ) durch appositionelles Knochenwachstum und trabekuläre Geflechtknochenneubildungen (KN). toluidingefärbte Ostim®-Stücke (TO) werden mit direktem Knochen-Osteoid-Kontakt in die Knochentrabekel integriert. Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 85. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 100-fache Vergrößerung.

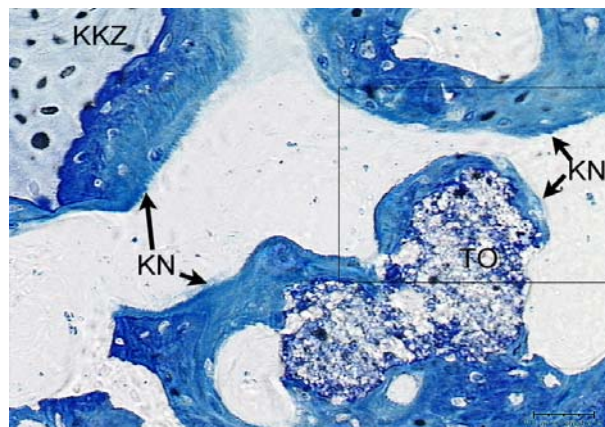


Abbildung 85: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 84. Knochentrabekel des Knorpel-Knochenzylinders (KKZ) mit aufgelagerten Knochenneubildungen (KN). Knöchern integrierte toluidingefärbte Implantatreste (TO). Rahmen: s. Abbildung 86. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 200-fache Vergrößerung.

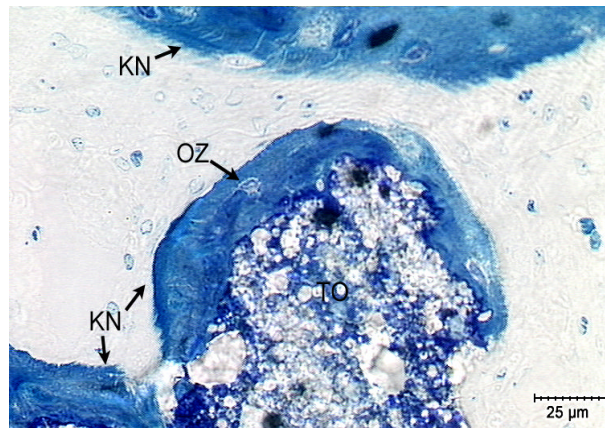


Abbildung 86: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 85. toluidinegefärbtes Implantatstück mit aufgelagerter Knochenneubildung (KN). OZ=Osteozyt. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

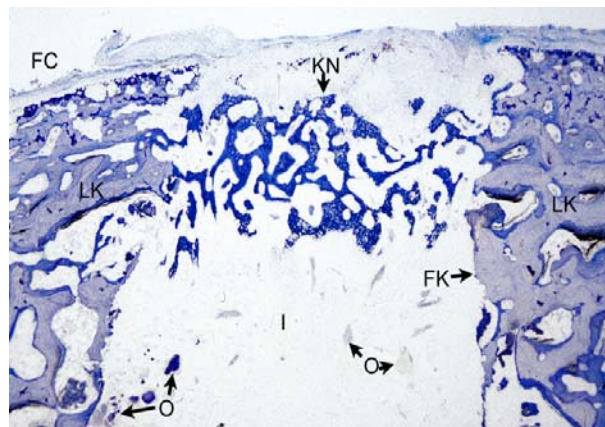


Abbildung 87: Bei einem Tier Absinken des Knorpel-Knochen-Zylinders im Implantationskanal (I) (Zylinder nicht im Bild). Ausbildung einer knöchernen Brücke durch Geflechtknochen (KN). FC=Femurcondyle. O=Ostim®-Stücke. FK=Fräskante. LK=epiphysärer Lagerknochen. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 12,5-fache Vergrößerung.

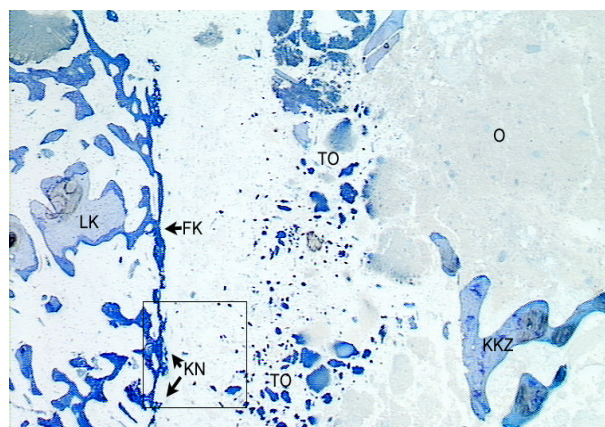


Abbildung 88: Metaphysärer Implantationskanal mit zentral kompaktem Implantat (O); - lagerknochennah schollig zerfallenes Ostim® plus mit Toluidinfärbung (TO). Fräskante (FK) mit beginnender Knochenneubildung (KN). LK= Lagerknochen. Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 89. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 25-fache Vergrößerung.



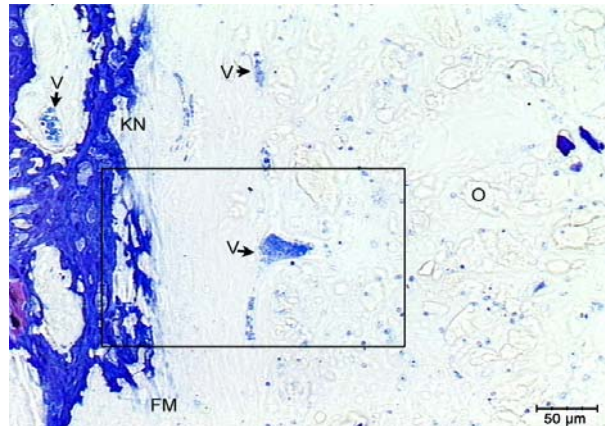


Abbildung 89: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 88. Von der Fräskante ausgehende Geflechtknochenneubildung (KN) mit ausstrahlender Fasermatrix (FM). Vaskuläre (V) und zelluläre Erschließung des granulär bis schollig zerfallenen Ostim® plus (O). Rahmen: s. Ausschnittvergrößerung Abbildung 90. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 100-fache Vergrößerung.

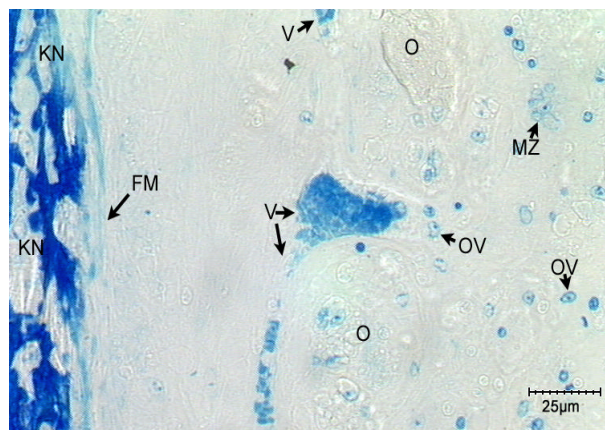


Abbildung 90: Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 89. Trabekuläre Geflechtknochenneubildungen (KN) (ausgehend von der metaphysären Fräskante) mit angrenzender mineralisierender Fasermatrix (FM). Zellulär-vaskuläre Erschließung des schollig zerfallenen Ostim® plus (O) durch ovoidkernige Zellen (OV), mehrkernige Zellen (MZ) und Gefäße (V). Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 400-fache Vergrößerung.

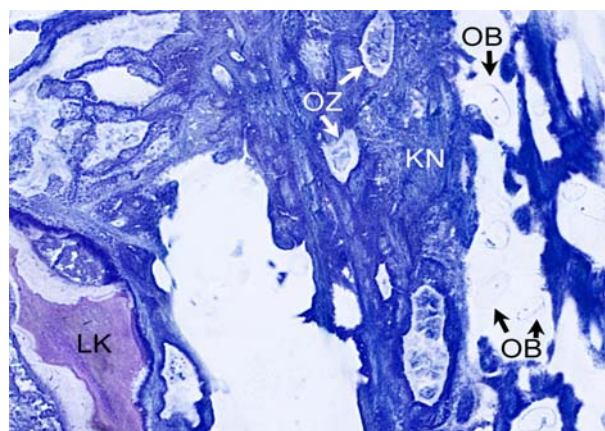


Abbildung 91: Vom Lagerknochen (LK) ausgehende Geflechtknochenneubildung (KN). OB=Osteoblasten. OZ=Osteozyten. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

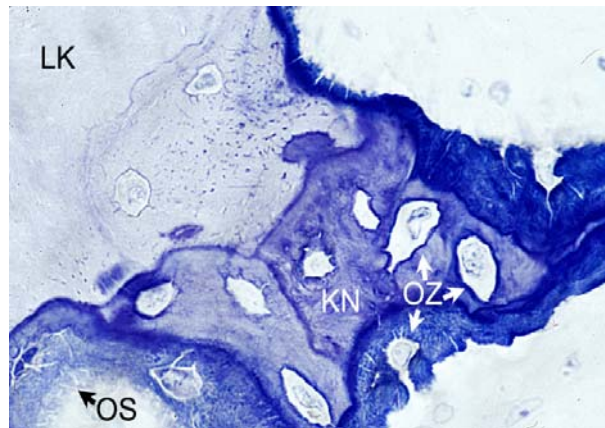


Abbildung 92: Unterschiedliche Stadien von Knochenneubildungen (KN) – angegliedert an metaphysären Lagerknochen (LK). OZ=Osteozyten. OS=Osteoidsaum. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

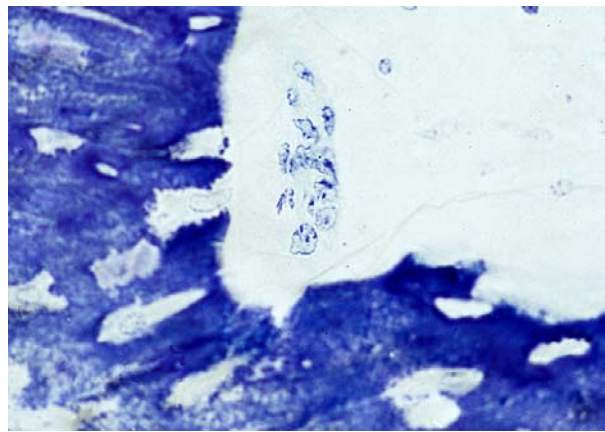


Abbildung 93: Mehrkerniger Osteoklast im Bereich einer Knochenneubildung. Im neu gebildeten Knochen zahlreiche Osteozyten. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

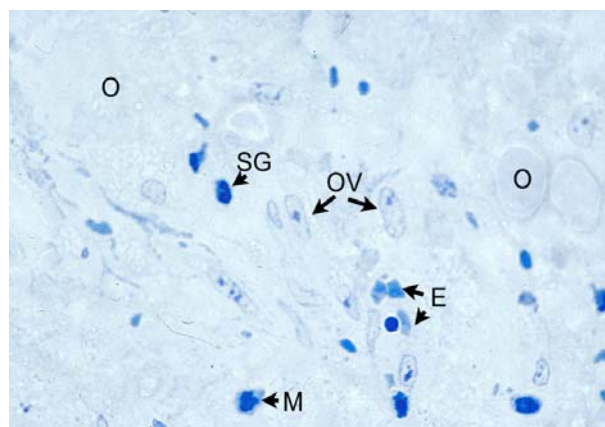


Abbildung 94: Zellulär durchsetztes, granulär aufgelockertes Ostim® plus (O) eines Zylinder-Lagerknochen-Spaltraumes. M=Makrophage. OVZ=ovalkernige Zellen. E=Erythrozyten. SG=Segmentkerniger Granulozyt. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 1000-fache Vergrößerung.

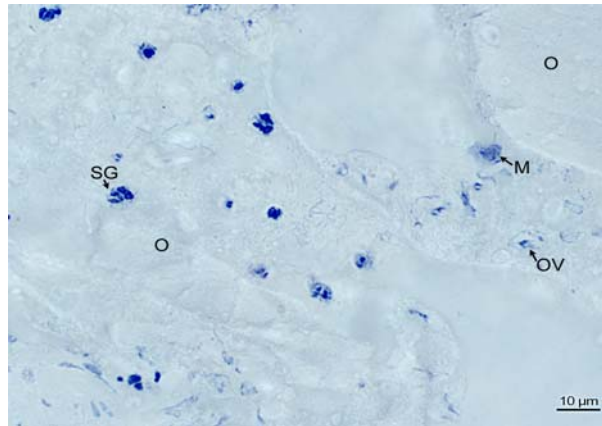


Abbildung 95: Zellulär durchsetztes, granulär aufgelockertes Ostim® plus (O). M=Makrophage. OV=ovalkernige Zelle. SG=Segmentkernige Granulozyten. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

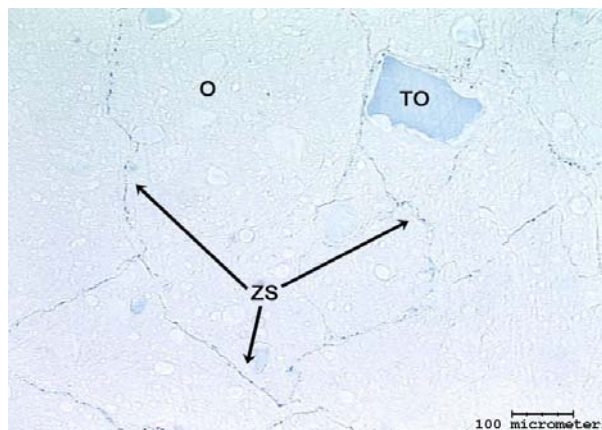


Abbildung 96: Zelluläre Erschließung des granulär strukturierten Ostim® plus im zentralen diaphysären Markraum durch Zellstraßen (ZS). Das Implantat ist weitestgehend ungefärbt mit einzelnen toluidinegefärbten Globuli (TO). Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.

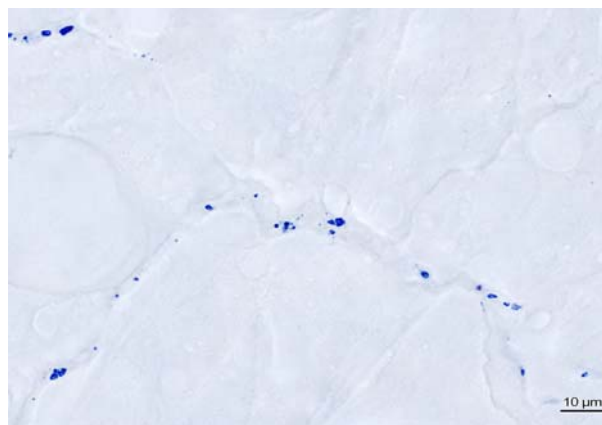


Abbildung 97: Kompaktes Ostim® plus des zentralen diaphysären Markraumes, das durch Zellstraßen erschlossen wird. Implantat: Ostim® plus. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen.



### **IV.3.3. Zusammenfassung der hellfeldmikroskopischen Ergebnisse**

- Eine zu beobachtende zelluläre Implantaterschließung, Neovaskularisation und Knochenneubildung sowie der Implantatabbau erfolgten jeweils vom Wirtsknochen aus.
- Es fand eine direkte Osteogenese statt, ohne die Ausbildung knorpeliger Zwischenstufen. Ostim®-umgebende Osteoblastenlayer mit Osteoidapposition auf Implantatoberflächen führten zu einer formschlüssigen knöchernen Integration einzelner Implantatstücke.
- Die zelluläre Reaktion zeigt eine initiale Implantaterschließung durch Makrophagen und segmentkernige Granulozyten. Begleitet von zunehmender Vaskularisation treten im Verlauf mehrkernige Riesenzellen vom ungeordneten Typ, ovalkernige Zellen, Osteoblasten und vereinzelt Osteoklasten auf. Fibroblasten kommen nur sporadisch vor.
- Es war eine geringgradige und über die Nachbeobachtungszeit leicht rückläufige granulozytäre Reaktion zu beobachten. Eine spezifische Entzündungsreaktion mit lymphozytären oder granulomatösen Komponenten trat nicht auf.
- Es bestand überwiegend ein direkter Implantat-Knochen- und Implantat-Zell-Kontakt. Lediglich bei Ostim® plus fanden sich vereinzelt geringe Mengen von Bindegewebsfasern, die dem Implantat aufgelagert waren. Eine bindegewebige Abkapselung im Sinne einer membranösen Einscheidung war nicht ausgebildet. Davon abzugrenzen ist eine im Bereich von Geflechtknochenneubildungen zu beobachtende ungefärbte Kollagenfasermatrix mit integrierten und umgebenden Osteoblasten. Diese geht direkt in Geflechtknochen trabekel über.
- In osteogenetisch aktiven Zonen wies das angrenzende Implantat eine Toluidinfärbung auf.
- Die Prüfschubstanz unterlag im Bereich von Knochenneubildungen einem vollständigen Abbau.

- Osteoklastäre Resorptionsprozesse fanden sich in sehr geringer Zahl an randständigen Trabekeln des Knorpel-Knochen-Zylinders. Bei hoher osteogener Aktivität war ein osteoklastäres Remodelling von neu gebildeten Geflechtknochentrabekeln nachweisbar.
- Das Knochenmark wies keine inflammatorischen oder fibrosierenden Prozesse auf. Der Wirtsknochen stellte sich vital dar.

**Die Gruppen 1 und 2 unterschieden sich hellfeldmikroskopisch von den clindamycinhaltigen Tieren der Gruppe 3 und 4 in folgenden Punkten:**

- Eine feinkristallinere Implantatstruktur im Gegensatz zu einem grobgranulärem Erscheinungsbild von Ostim<sup>®</sup> plus.
- Zelluläre und vaskuläre Implantaterschließung, Knochenneubildungen und der Ostim<sup>®</sup>-Abbau traten früher und in stärkerem Maße auf, als unter Clindamycinzusatz. Dies wurde insbesondere bei der osteogenetisch gering aktiven Gruppe 3 deutlich.
- Die granulozytäre Reaktion war geringer ausgeprägt.
- Mehrkernige Riesenzellen vom ungeordneten Typ fanden sich deutlich häufiger.
- Korrelierend mit der höheren osteogenetischen Aktivität zeigte sich eine intensivere Toluidinfärbung der Prüfsubstanz im Bereich von Knochenneubildungen.
- Bindegewebsfasern waren nicht ausgebildet.
- Die Knorpel-Knochen-Zylinder dislozierten in geringerem Maße.
- Implantat, welches fern von osteogenetischen Prozessen lag, wies keine Toluidinfärbung auf. Bei den clindamycinhaltigen Gruppen 3 und 4 waren hier hellblau gefärbte Ostim<sup>®</sup>-Globuli diffus eingestreut.

Tabelle 6: Tabellarische Zusammenfassung der hellfeldmikroskopischen Befunde in der Toluidinfärbung.

Gruppe	Präparat-Nr.	Knochenneubildung Defektkanal / Markraum				Osteoblasten				Osteoblastenlayer				Osteoidsäume				Ostim®-aufgelagertes Osteoid + Osteoblasten				Formschlüssig Ostim®-umgebender Knochen			
		Spalt-räume <sup>1</sup>	Epi	Met	Dia	Epi	Zyl	Met	Dia	Zyl	Epi	Met	Dia	Zyl	Epi	Met	Dia	Spalt-räume	Epi	Met	Dia	Spalt-räume	Epi	Met	Dia
<b>1</b> (Ostim®/ 2 w)	34	+	++	++	++	++	++	+++	++	+	+	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
	35	-	-	+	-	+	-	++	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
	36	++	++	+	-	++	++	++	-	++	++	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
	37	-	-	+	-	+	+	++	-	-	-	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>2</b> (Ostim®/ 4 w)	38	++	++	++	+	++	+	+++	+	+	++	+++	+	+	+	+	+	+	+	++	-	+	+	+++	-
	39	++	++	++	-	+++	+	+++	-	+	++	+++	-	+	+	++	-	Ø	Ø	++	-	Ø	Ø	+++	-
	40	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	+++	++	Ø	+	+++	++
	41	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	+	++	++	-	+	++	+++	-
<b>3</b> (Ostim® plus/ 2 w)	30	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	31	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	32	-	+	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4</b> (Ostim® plus/ 4 w)	26	+++	+++	++	-	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
	28	+++	++	-	-	+++	+++	+	+	+	++	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	-	-
	29	++	+	+	-	++	++	++	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
	24	-2	+	+	+	++	++	++	+	-	+	++	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	33	+3	++	+	-	++	++	+	+	-	++	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-

+++ = starke Knochenneubildung, Ostim®-Blau- bis -Violett-färbung/ vollständige trabekuläre Durchbauung der Spalträume, zahlreiche Blutgefäße und Zellen sowie extraossäre Fasermatrix

++ = mäßige Knochenneubildung, Ostim®-Blau-färbung; mäßig viele Blutgefäße, Zellen, extraossäre Fasermatrix

+ = geringe trabekuläre Knochenneubildung, hellblaue bzw. globuläre Ostim®-Färbung; - wenige Blutgefäße, Zellen, extraossäre Fasermatrix

- = keine trabekuläre Knochenneubildung, Ostim®-Färbung, Blutgefäße, Zellen, extraossäre Fasermatrix

Ø = kein(e) Zylinder/Ostim®/extraossäre Fasermatrix

1 Zwischen replantiertem Zylinder und umgebenden Lagerknochen (Breite: ca. 400 µm)

2 Zylinderrest bis zur Epiphysenfuge abgesunken - breite Spalträume

3 Gelenknahe Knochenbrücke ausgebildet; Räume zwischen Zylinder und Lagerknochen ohne Knochenneubildung

Tabelle 7: Fortsetzung der tabellarischen Zusammenfassung der hellfeldmikroskopischen Befunde.

Gruppe	Präp. Nr.	Implantatmenge				Makrophagen			Mehrkernige Riesenzellen			Blutgefäße				Granulozyten				Osteoklasten			Extraossäre Fasermatrix			
		Spalt-räume	Epi	Met	Dia	Epi	Met	Dia	Epi	Met	Dia	Zyl	Epi	Met	Dia	Spalt-räume	Epi	Met	Dia	Epi	Met	Dia	Spalt-räume	Epi	Met	Dia
<b>1</b> (Ostim®/ 2 w)	34	++	++	++	+	++	+++	+	+	++	+	+	++	+++	+++	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	++
	35	++	+++	+++	+++	-	++	+	-	++	+	-	-	+++	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	36	++	++	+++	+++	++	++	+	+	+++	-	+	++	++	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
	37	++	++	+++	+++	+	++	+	-	+++	-	-	+	+++	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<b>2</b> (Ostim®/ 4 w)	38	+	+	++	+++	+	++	-	+++	++	-	-	+	++	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	++	-
	39	-	-	++	+++	+	++	-	++	++	-	-	+	+	-	Ø	+	+	-	+	+	-	+	+	++	+
	40	+	+	++	+++	+	++	++	++	+++	++	+	+	++	+	Ø	+	+	+	+	+	-	Ø	++	++	++
	41	+	+	++	+++	++	++	+	+++	+++	+	-	+	+	-	+	+	+	+	++	++	+	Ø	+	+	+
<b>3</b> (Ostim® plus/ 2 w)	30	++	++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	31	++	++	++	+++	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	32	++	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	25	++	++	++	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	27	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>4</b> (Ostim® plus/ 4 w)	26	+	+	++	+++	+	++	+	+	+++	-	++	++	++	-	+	-	+	-	+	++	-	-	-	+	-
	28	-	-	++	+++	++	+++	-	++	++	-	+	+++	+++	-	Ø	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	29	+	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	-	+	+++	+++	++	+	+	+	+	++	-	-	+	-	-	+
	24	+	++	+	++	++	+	+	++	++	+	++	+++	+++	++	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-
	33	++	+	+++	++	++	+	+	++	+	+	+	++	++	++	-	+	+	+	+	-	+	-	++	-	-

- +++ = starke Knochenneubildung, Ostim®-Blau- bis -Violettffärbung/ vollständige trabekuläre Durchbauung der Spalträume  
 zahlreiche Blutgefäße, Zellen, extraossäre Fasermatrix
- ++ = mäßige Knochenneubildung, Ostim®-Blaufärbung  
 mäßig viele Blutgefäße, Zellen, extraossäre Fasermatrix
- + = geringe trabekuläre Knochenneubildung, hellblaue bzw. globuläre Ostim®-Färbung  
 wenige Blutgefäße, Zellen, extraossäre Fasermatrix
- = keine trabekuläre Knochenneubildung, Ostim®-Färbung, Blutgefäße, Zellen, extraossäre Fasermatrix
- Ø = kein(e) Zylinder/Ostim®/extraossäre Fasermatrix

## **IV.4. Fluoreszenzoptische Ergebnisse**

### **IV.4.1. Ostim®**

#### **IV.4.1.1. Gruppe 1 (Ostim® - Zwei Wochen postoperativ)**

*Calceingrünmarkierung: siebter und zehnter postoperativer Tag*

Die hellfeldmikroskopisch beschriebenen lagerknochenständigen Geflechtknochen-neubildungen wiesen einen kleineren, markraumzugewandten Saum von nicht fluoreszierendem Gewebe und einen größeren, lagerknochenständigen Anteil von schaumig-granulärer Calceingrünfluoreszenz auf (s. Abbildung 101). Dies entspricht einer beginnenden Knochenneubildung vor dem siebten postoperativen Tag.

Das Implantat fluoreszierte in osteogenetisch aktiven Zonen homogen, während es in den übrigen Bereichen keine Fluorochromaufnahme aufwies (s. Abbildung 99).

Die Lagerknochenspongiosa präsentierte sich mit trabekelumgebenden Calceingrüneinzel- und -doppelbanden (s. Abbildung 100). Diese Markierung fehlte in der anterioren epiphysären Kondylenregion zweier Tiere.

#### **IV.4.1.2. Bilddokumentation – Fluoreszenzmikroskopie Gruppe 1 (Ostim® – Zwei Wochen postoperativ)**

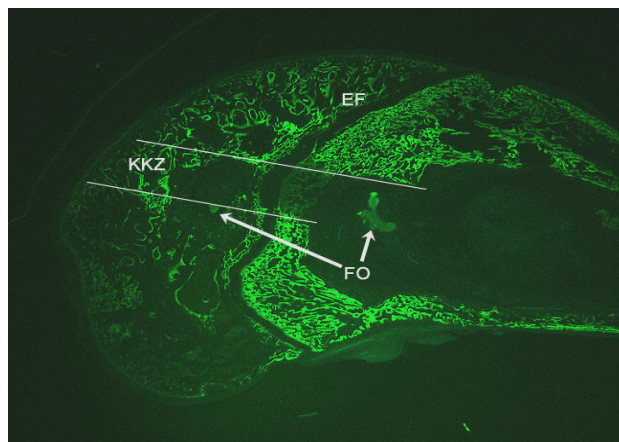


Abbildung 98: Calceingrünmarkierte Knochenneubildungen des Lagerknochens und des replantierten Knorpel-Knochen-Zylinders (KKZ). Implantationskanal fluoreszenzfrei (weiße Linien markieren die Fräskanten). Einzelne fluoreszenzmarkierte Ostim®-Schollen (FO). EF=Epiphysenfuge. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. Sechsfache Vergrößerung.

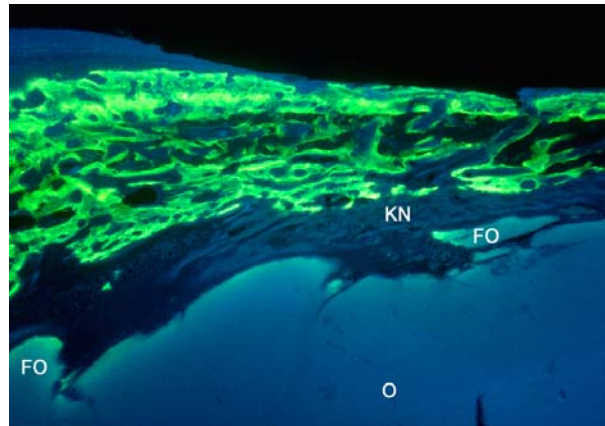


Abbildung 99: Diaphysentrichter mit lagerknochenständiger trabekulärer Knochenneubildung (KN) und angrenzendem fluoreszierenden Ostim® (FO). Die zentrale Implantatmasse des diaphysären Markraumes stellt sich fluoreszenzfrei dar (O). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 12,5-fache Vergrößerung.

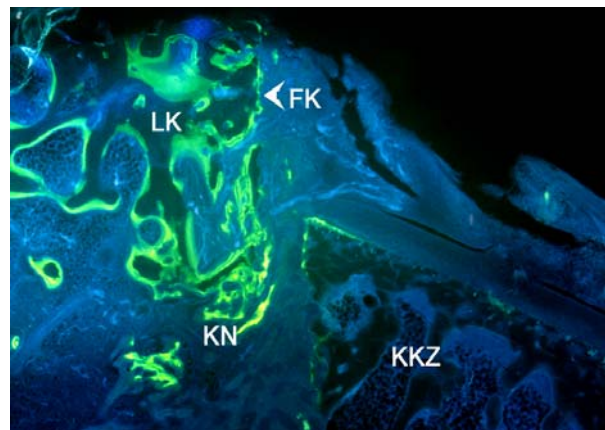


Abbildung 100: Spaltraum zwischen epiphysärer Spongiosa (LK) und replantiertem Knorpel-Knochen-Zylinder (KKZ): Lagerknochenständige reparative trabekuläre Geflechtknochenneubildung (KN) mit dem Label des siebten bis zehnten postoperativen Tages. Eine vollständige Durchbauung des Spaltraumes wird nicht erreicht. FK=Fräskante. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 100-fache Vergrößerung.

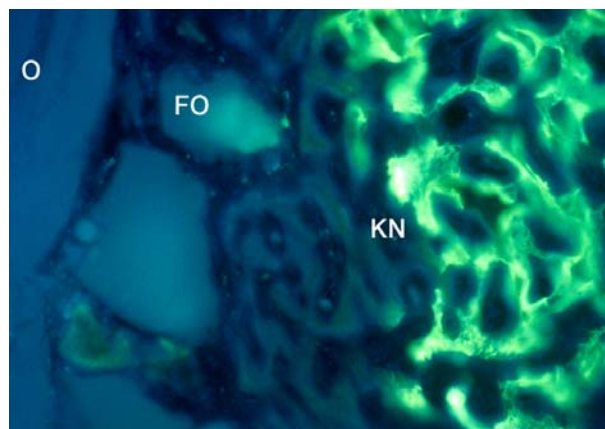


Abbildung 101: Metaphysäre Geflechtknochenneubildungen, welche lagerknochenständig das Label des siebten und zehnten postoperativen Tages aufweisen und dieses zum Fräskanal hin verliert. FO=Fluoreszenzmarkiertes Ostim®, unmarkiertes Implantat im zentralen Implantationskanal (O). Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Zwei Wochen. 200-fache Vergrößerung.

#### **IV.4.1.3. Gruppe 2 (Ostim® - Vier Wochen postoperativ)**

*Calceingrünmarkierung:*                      *siebter und zehnter postoperativer Tag*

*Alizarinkomplexonmarkierung:*        *21. und 26. postoperativer Tag*

Die in der Hellfeldmikroskopie beschriebenen neu gebildeten Knochentrabekel trugen lagerknochennah ein schwaches, homogenes Calceingrünlabel sowie umgebende Alizarineinzel- und -doppelbanden (s. Abbildung 105). Zum Markraum-zentrum hin überwog eine schaumig-granuläre Alizarinfluoreszenz (s. Abbildung 104). Daran schloss sich ein schmaler Saum unmarkierter Knochenbälkchen an.

In allen osteogenetisch aktiven Bereichen fluoreszierten die Implantatreste homogen (s. Abbildung 104 und Abbildung 105). Der metaphysäre Implantationskanal enthielt bei drei von vier Tieren nur markiertes Implantat. Bei dem Tier mit der geringsten Knochenneubildung fand sich hier zentral unmarkiertes Ostim®. Das Implantat des diaphysären Markraumzentrums war bei allen Tieren überwiegend fluoreszenzfrei. In osteogenetisch hoch aktiven Bereichen waren schaumig-granuläre und bandenförmige Alizarinfluoreszenzen dem Ostim® direkt aufgelagert (s. Abbildung 104 und Abbildung 105).

Die replantierten Knorpel-Knochen-Zylinder zeigten trabekelumgebende Alizarindoppelbanden. Bei vollständig knöcherner Integration des Zylinders (zwei Tiere) erstreckte sich dies über sämtliche Trabekel des Zylinders; bei inkompletter Einheilung nur peripher.

Die Lagerknochenspongiosa bestand fluoreszenzoptisch aus unmarkierten kompakten Trabekeln mit umgebenden Calceingrün- und Alizarindoppelbanden (s. Abbildung 102).

Die hellfeldmikroskopisch beschriebene Fasermatrix zeigte keine Fluorochromaufnahme.



#### **IV.4.1.4. Bilddokumentation – Fluoreszenzmikroskopie Gruppe 2** **(Ostim® - Vier Wochen postoperativ)**

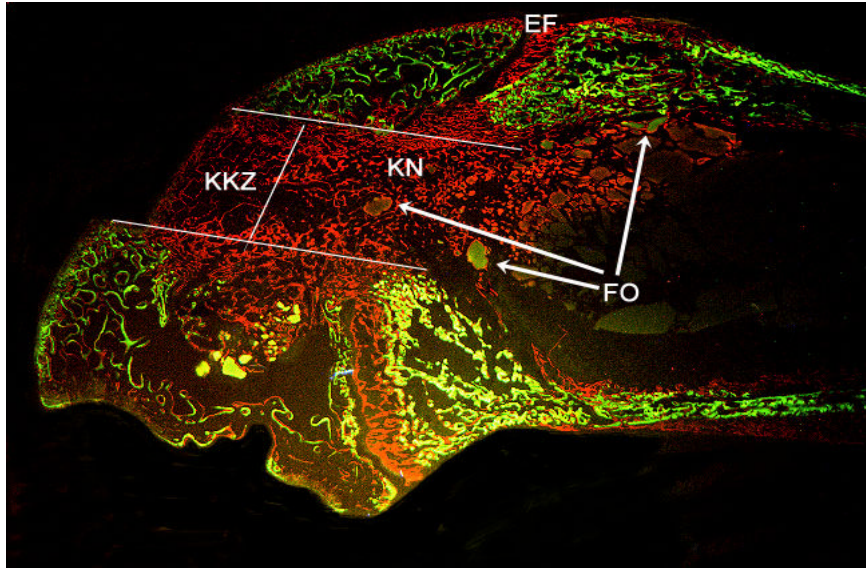


Abbildung 102: Fast vollständig knöchern durchbauter Implantationskanal mit dem Alizarinlabel (rot) des 21. und 26. postoperativen Tages. KN=Knochenneubildungen, Linien: ehemalige Fräskanten, KKZ=replantierte Knorpel-Knochen-Zylinder. Vereinzelt Ostim®-Reste mit Calceingrün- und Alizarinfluoreszenz (FO). EF-Epiphysenfuge. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. Sechsfache Vergrößerung.

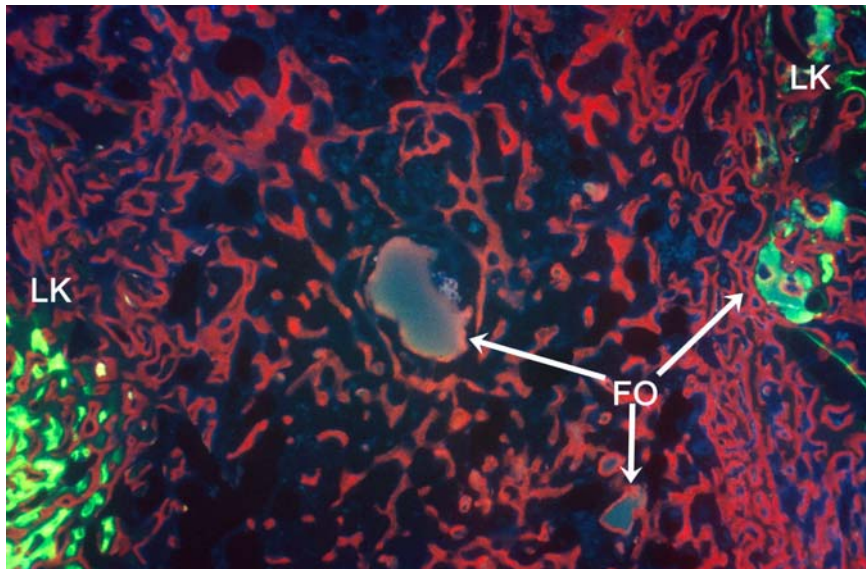


Abbildung 103: Annähernd vollständig knöchern durchbauter metaphysärer Fräskanal mit dem Label des 21. – 26. postoperativen Tages. Weitestgehend abgebautes Implantatmaterial. Einzelne Ostim®-Reste mit oberflächen-/randbetonter Alizarinfärbung. Im Lagerknochen vereinzelte calceingrün-fluoreszierende intertrabekuläre Implantatreste. FO=Fluoreszierendes Ostim®, LK=Lagerknochen. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 25-fache Vergrößerung.



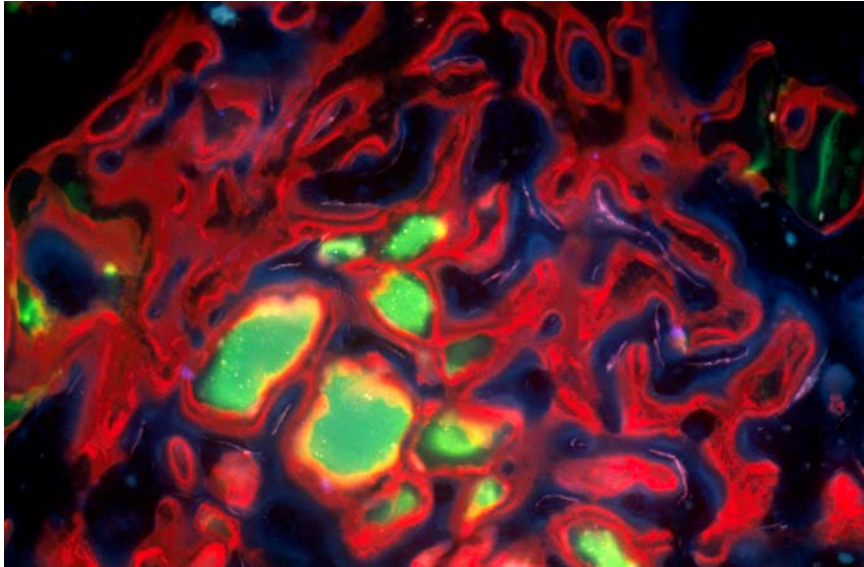


Abbildung 104: Zentraler metaphysärer Implantationskanal mit calceingrünfluoreszierenden Ostim®-Schollen und umgebenden Alizarindoppelbanden. Formschlüssige Integration der Implantatreste in trabekuläre Knochenneubildungen. Bildperipherie: Knochenneubildungen mit lamellärer Struktur ohne Ostim®-Reste. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 200-fache Vergrößerung.

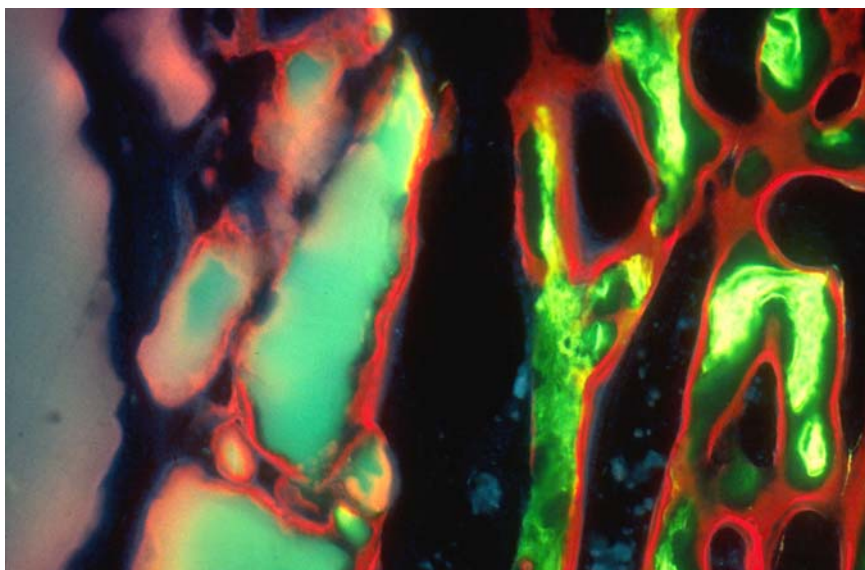


Abbildung 105: Metaphysärer Implantationskanal: Rechte Bildhälfte: Vom Lagerknochen ausgehender trabekulärer Geflechtknochen mit dem Calceinlabel des siebten und zehnten postoperativen Tages sowie aufgelagerter lamellärer Mineralisation (Alizarinbande). In der linken Bildhälfte angrenzende calceingrün- und alizarinmarkierte Ostim®-Schollen, teilweise mit aufgelagerten Alizarinbanden. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 400-fache Vergrößerung.

## IV.4.2. Ostim<sup>®</sup> plus

### **IV.4.2.1. Gruppe 3 (Ostim<sup>®</sup> plus - Zwei Wochen postoperativ)**

Bei dieser Gruppe fand keine Fluorochrommarkierung statt.

### **IV.4.2.2. Gruppe 4 (Ostim<sup>®</sup> plus - Vier Wochen postoperativ)**

<i>Calceingrünmarkierung:</i>	<i>siebter und zehnter postoperativer Tag</i>
<i>Alizarinkomplexonmarkierung:</i>	<i>21. und 26. postoperativer Tag</i>

Zwischen den unterschiedlichen Clindamycinkonzentrationen bestanden keine signifikanten fluoreszenzoptischen Unterschiede, sodass die Darstellung der Ergebnisse gemeinsam erfolgt.

Im Vergleich zu den Gruppen 1 und 2 war eine deutlich geringere Fluoreszenz zu verzeichnen (s. Abbildung 106). Die vorhandenen Knochenneubildungen trugen ausschließlich das Label der Alizaringabe. Die lagerknochennahen Knochenbälkchen wiesen Alizarineinzel- und –doppelbanden, welche zum Markraum hin einer schaumig-granulären Fluoreszenzstruktur wichen. Implantat-angrenzend war ein schmaler unmarkierter Knochensaum zu beobachten. Das Ostim<sup>®</sup> plus präsentierte sich größtenteils unmarkiert. In osteogenetisch aktiven Zonen bestand eine homogene Alizarinaufnahme (s. Abbildung 107).

Die Lagerknochentrabekel wiesen umgebende Calceineinzel- und Alizarindoppelbanden auf (s. Abbildung 107). Die Spongiosabälkchen der replantierten Knorpel-Knochen-Zylinder enthielten nur bei knöchernem Kontakt mit epiphysärem Lagerknochen angelagerte Alizarineinzel- und –doppelbanden.

Die hellfeldmikroskopisch beschriebene Fasermatrix zeigte keine Fluorochromaufnahme.

**IV.4.2.3. Bilddokumentation – Fluoreszenzmikroskopie Gruppe 4**  
**(Ostim® plus – Vier Wochen postoperativ)**

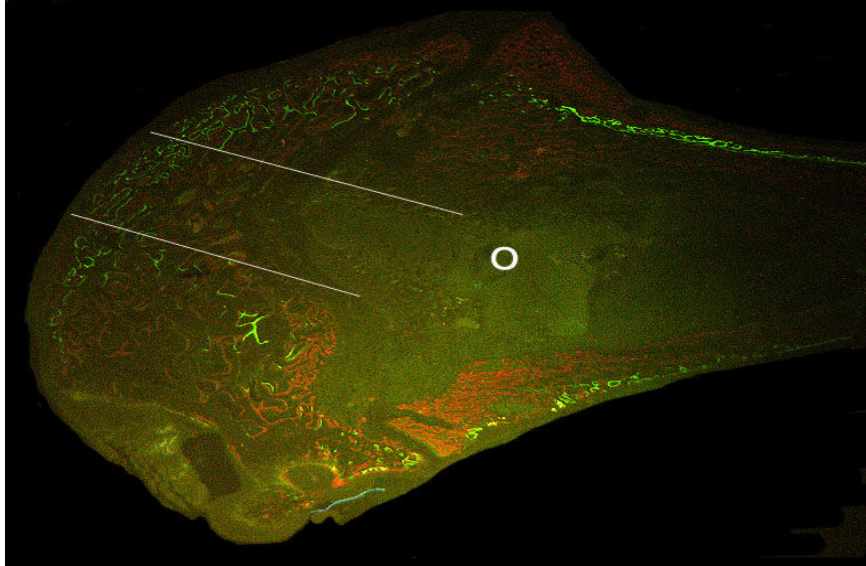


Abbildung 106: Insgesamt deutlich verminderte Fluoreszenzintensität. Im metaphysären Implantationskanal sowie im zentralen Markraum findet sich unmarkiertes Ostim® plus (O). Weiße Linien=Fräskanten. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. Sechsfache Vergrößerung.

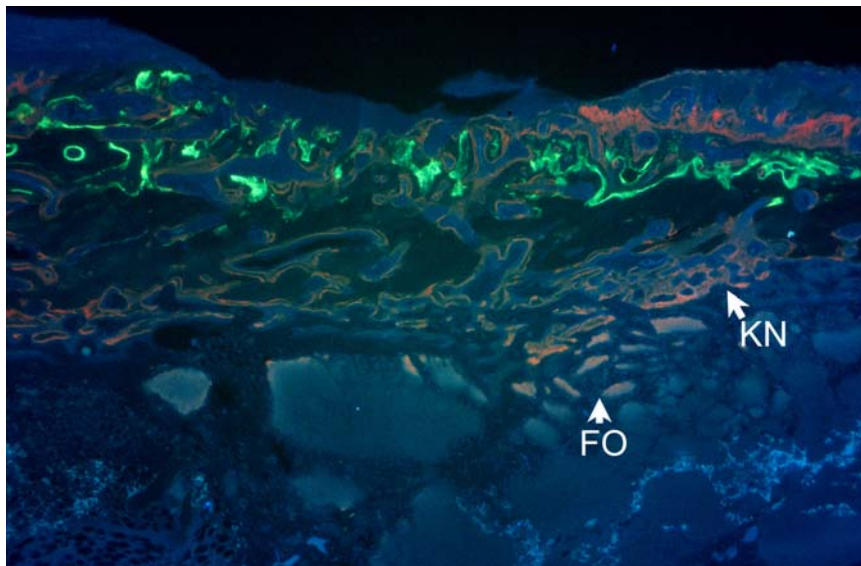


Abbildung 107: Diaphysentrichter mit kortikalen Lagerknochenfluoreszenzen, endostaler alizaringefärbten Knochenneubildungen (KN) und angrenzendem alizarinfluoreszierendem Ostim® plus (FO). Im osteogenetisch inaktiven zentralen Markraum stellt sich das Implantat ungefärbt dar. Implantat: Ostim®. Nachbeobachtungszeit: Vier Wochen. 25-fache Vergrößerung.

#### **IV.4.2.4. Zusammenfassung der fluoreszenzoptischen Ergebnisse**

- Die clindamycinhaltigen Gruppen wiesen eine schwächere und flächenanteilig geringere Fluoreszenz auf, als die Vergleichsgruppen.
- Regelmäßig auftretende reparative Geflechtknochenneubildungen begannen bei Ostim® vor dem siebten bzw. zehnten postoperativen Tag. Unter Clindamycinzusatz trugen sie alleinig die Alizarinmarkierung des 21. und 26. postoperativen Tages.
- Bei vierwöchiger Nachbeobachtungszeit mit Ostim® stellten sich die neu gebildeten Knochentrabekel markraumseitig schaumig-granulär strukturiert dar. Lagerknochennah waren sie von Alizarindoppelbanden umgeben und wiesen damit auf eine lamelläre Umstrukturierung am 21.-26. postoperativen Tag hin. Bei Ostim® plus waren solche bandenförmigen Fluoreszenzen in neu gebildeten Knochentrabekeln nicht nachweisbar.
- In Knochenneubildungszonen zeigte Ostim® und Ostim® plus ein homogenes Fluorochromsignal in Calceingrün und/oder Alizarinrot, welches bezüglich Intensität und Flächenausdehnung positiv mit der osteogenetischen Aktivität korrelierte.
- In osteogenetisch hoch aktiven Bereichen der Gruppe 2 waren schaumig-granuläre und bandenförmige Alizarinfluoreszenzen dem Ostim® direkt aufgelagert. Die hellfeldmikroskopisch beschriebene Kollagenfasermatrix zeigte keine Fluorochromaufnahme. Die Lagerknochentrabekel waren von Fluoreszenzbanden der jeweils applizierten Fluorochrome umgeben.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die fluoreszenzoptischen Ergebnisse der einzelnen Tiere bzw. Präparate.

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der fluoreszenzoptischen Ergebnisse.

Gruppe	Präparat-Nr.	Knochenneubildung Defektkanal/Markraum			Ostim®-Fluoreszenz			Zylinder-fluoreszenz	Lagerknochen-fluoreszenz		
		Epiphys. Spalt-räume <sup>4</sup>	Meta-physe	Dia-physe	Epi-physe	Meta-physe	Dia-physe		Epi-physe	Meta-physe	Dia-physe <sup>5</sup>
<b>1</b> (Ostim®, 2 w)	20	+	+	+	+	+	++	-	+	+++	++
	21	++	+	-	-	+	-	-	++	+++	++
	23	++	+	-	+	+	-	-	++	+++	++
	24	+	+	-	-	+	-	-	++	+++	++
<b>2</b> (Ostim®, 4 w)	38	++	++	+	Ø	+++	-	+	+++	+++	+++
	39	++	++	-	Ø	+++	-	+	++	+++	+++
	40	+++	++	++	Ø	+++	++	+++	+++	+++	+++
	41	+++	++	+	Ø	+++	+	+++	+++	+++	+++
<b>4</b> (Ostim plus, 4 w)	26	+++	+	-	Ø	+	-	++	++	++	++
	28	+++	+	-	Ø	+	-	++	+	++	++
	29	+	+	-	+	+	-	+	+	++	+
	24	+	+	-	-	+	-	+	+	++	+
	33	++	+	-	+	-	-	+	++	+	+

+++ = intensive Fluoreszenz bzw. vollständige trabekuläre Durchbauung

++ = mäßige Fluoreszenz bzw. trabekuläre Knochenneubildung

+ = schwache oder nur vereinzelte Fluoreszenz bzw. wenig trabekuläre Knochenneubildung

- = keine Fluoreszenz bzw. trabekuläre Knochenneubildung

Ø = kein Ostim® vorhanden

4 Zwischen replantiertem Zylinder und umgebendem Lagerknochen (ca. 400 µm)

5 End- und periostal betonte Fluoreszenz

## **IV.5. Pharmakokinetische Untersuchungen**

Um die Eignung von Ostim<sup>®</sup> plus als implantier- und resorbierbares Antibiotikum-trägersystem für die Behandlung von Knocheninfektionen zu untersuchen, erfolgten neben einer histologischen Beurteilung die Messung von lokalen und systemischen Wirkstoffspiegeln sowie eine Charakterisierung der Freisetzungskinetik in vitro.

### **IV.5.1. In-vitro-Elutionsversuch**

Während der dreitägigen Elution der sechs Ostim<sup>®</sup> plus-gefüllten Nylonbeuteln in Phosphatpuffer erwies sich die Prüfsubstanz als weitestgehend lösungsstabil. Nach zwölfstündiger Elution war eine diskrete Trübung des Phosphatpuffers zu erkennen. Die Ostim<sup>®</sup>-Menge in den Beuteln reduzierte sich während des Versuchs nicht merklich.

Die sechs Beutel enthielten durchschnittlich 129,05 mg Clindamycin. Hiervon gaben sie in der ersten Stunde im Mittel 1282,08 µg/ml/h (SD: 127,60 µg/ml), entsprechend 6410,40 µg/h (SD: 637,98 µg) bzw. 4,97% ab. In der zweiten Stunde verringerte sich dies auf durchschnittlich 399,57 µg/ml/h (SD: 12,42 µg/ml/h) bzw. 1997,85 µg/h (SD: 62,09 µg/h). Von der siebten zur achten Stunde betrug die Abgabe im Mittel 3,29 µg/ml/h (SD: 1,22 µg/ml/h) bzw. 16,47 µg/h (SD: 6,12 µg/h). Im Zeitraum von acht bis 24 Stunden wurden im Mittel 0,21 µg/ml/h (SD: 0,11 µg/ml/h) bzw. 1,03 µg/h (SD: 0,56 µg/h) freigesetzt. In den restlichen 48 Stunden betrug die stündliche Abgabe durchschnittlich 0,01 µg/ml/h bzw. 0,05 µg/h. Dies veranschaulicht die folgende graphische Darstellung (s. Abbildung 108).

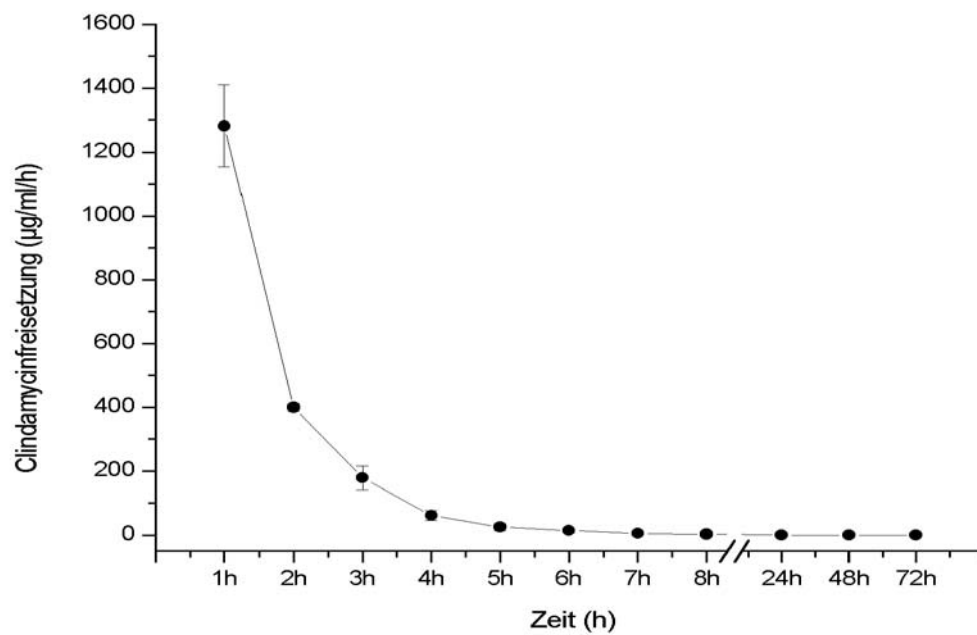


Abbildung 108: In-vitro-Freisetzungskinetik von Ostim® plus 25. Durchschnittliche Ostim®-Menge/Nylonbeutel: 516,18 g; 129,05 mg Clindamycin. Eluatmenge: 5 ml. Temperatur: 37 °C. Stichprobenumfang: 6. Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung. Auf Grund geringer Variabilitäten ist die Standardabweichung nur beim 1- und 3h-Wert erkennbar.

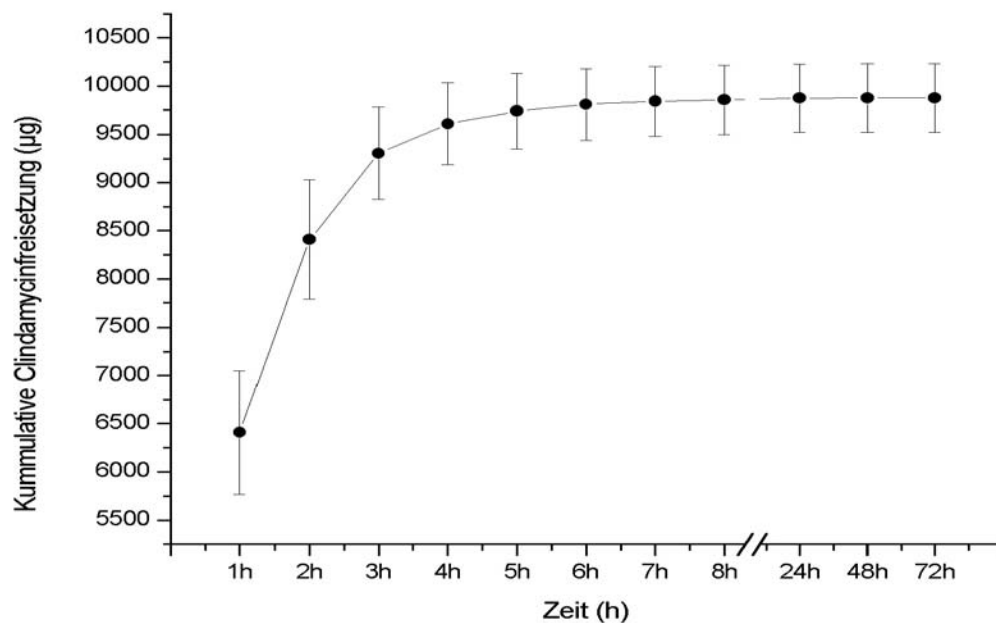


Abbildung 109: Kumulative In-vitro-Freisetzung von Ostim® plus 25 im dreitägigen Elutionsversuch. Durchschnittliche Ostim®-Menge/Nylonbeutel: 516,18 mg; 129,05 mg Clindamycin. Eluatmenge: 5 ml. Elutionstemperatur: 3 °C. Stichprobenumfang: 6. Arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung.

Während des gesamten Versuchszeitraumes (72 h) setzte Ostim® plus 25 im Mittel insgesamt 9877,25 µg (SD: 352,13 µg), entsprechend 7,65% des initial vorhandenen Clindamycins frei. Innerhalb der ersten Stunde traten 4,97%, nach zwei Stunden kumulativ 6,25% und nach vier Stunden 7,45% in das Eluat über. Nach acht Stunden waren insgesamt 9857,55 µg (SD: 357,12 µg) bzw. 7,65% des Antibiotikums freigesetzt worden. Bis zum Versuchsende erhöhte sich diese Menge geringfügig auf 9877,25 µg (SD: 352,13 µg) (7,65%) (s. Abbildung 109 und Abbildung 110).

Von der abgegebenen Antibiotikummenge wurden 64,90% innerhalb der ersten Stunde, 97,31% in den ersten vier Stunden und 99,80% innerhalb der ersten acht Stunden abgegeben.

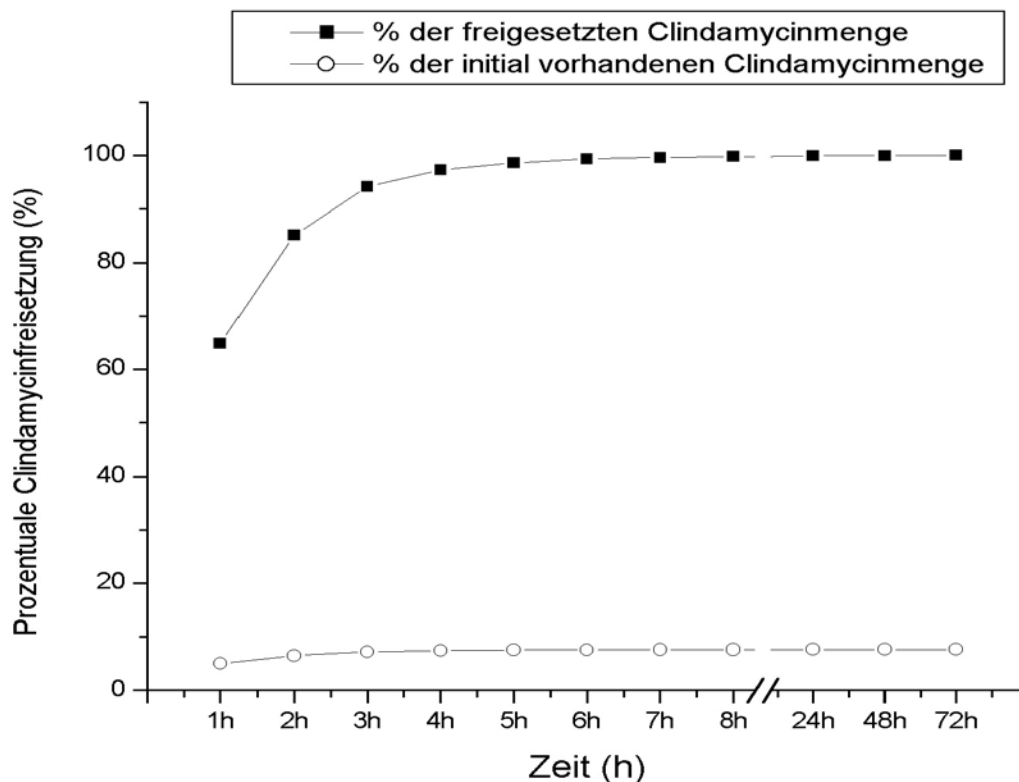


Abbildung 110: Kumulative In-vitro-Freisetzung von Ostim® plus 25 im dreitägigen Elutionsversuch. Prozentuale Anteile an der Clindamycing Gesamtmenge (129,05 mg) bzw. der kumulativ freigesetzten Menge. Arithmetische Mittelwerte.



## IV.5.2. In-vivo-Untersuchungen

### IV.5.2.1. Lokale Clindamycinkonzentrationen

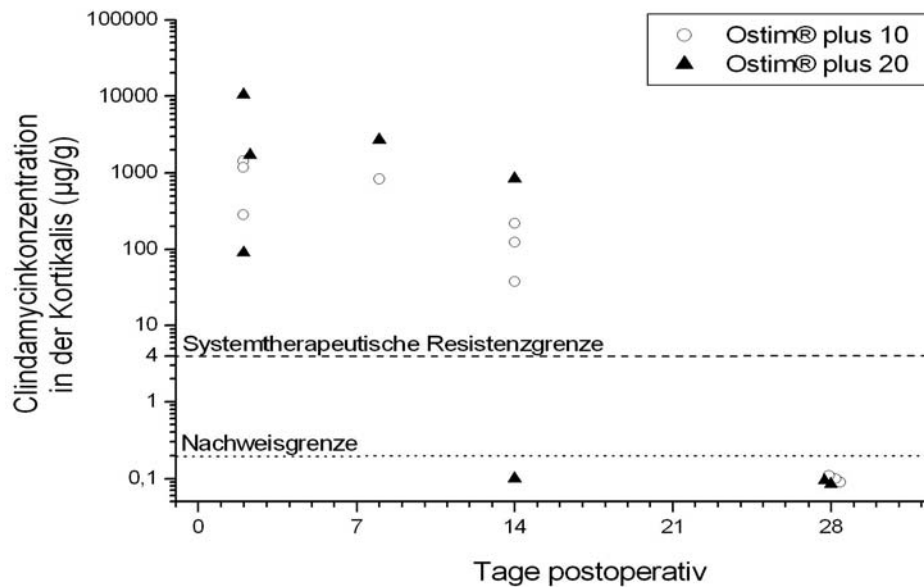


Abbildung 111: Kortikale Clindamycinkonzentrationen nach Implantation von ca. 1 g Ostim® plus 10/20 in den Femurmarkraum von 18 Kaninchen. Einzelwerte.

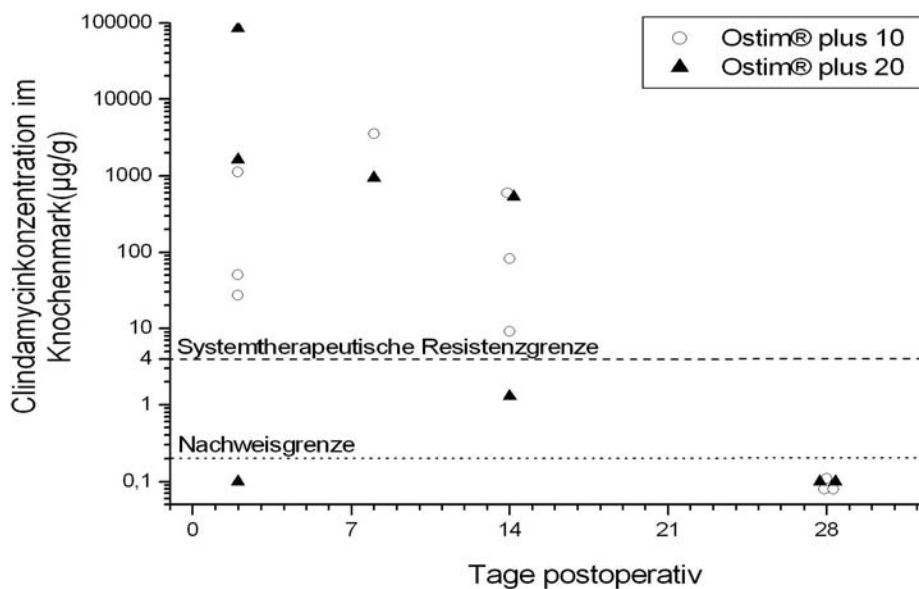


Abbildung 112: Clindamycinkonzentrationen im Knochenmark nach Implantation von ca. 1 g Ostim plus 10/20 in den Femurmarkraum von 18 Kaninchen. Einzelwerte.

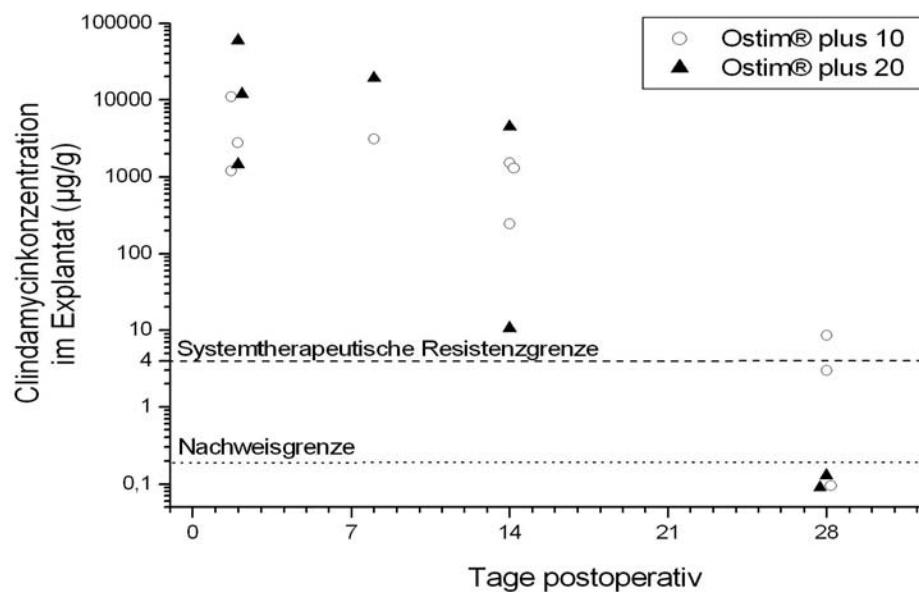


Abbildung 113: Clindamycinkonzentration in der Prüfsubstanz bei Explantation; vorherige Implantation von Ostim plus 10/20 in den Femurmarkraum von 18 Kaninchen. Einzelwerte.

Die Werte des zweiten und achten postoperativen Tages stammen aus der Analyse der acht frühzeitig verstorbenen Tiere. Bei den Messungen des 14. und 28. post-operativen Tages handelt es sich um geplante Nachbeobachtungszeiten.

Die Clindamycinkonzentration in der implantatumgebenden Kortikalis und dem angrenzenden Knochenmark überstieg innerhalb der ersten 14 Tage postoperativ bei elf von 13 Tieren bzw. 23 von 26 Messwerten die systemtherapeutische Resistenzgrenze (4 µg/g).

Die implantatumgebende Kortikalis wies zwei Tage postoperativ bei Ostim® plus 10 einen medianen Clindamycingehalt von 1178,2 µg/g (Range: 1149,8 µg/g) bzw. 1726,7 µg/g (Range: 10414,6 µg/g) bei Ostim® plus 20 auf; das angrenzende Knochenmark enthielt im Median 50,5 µg/g (Range: 1097,5 µg/g) bzw. 1636 µg/g (Range: 85071,9 µg/g) Clindamycin.

Zwei Wochen postoperativ betrug der Median der kortikalen Antibiotikumkanzenzration 124,2 µg/g (Range: 180,6 µg/g) bei Ostim® plus 10 und 421,4 µg/g (Range: 842,5 µg/g) bei Ostim® plus 20. Im Knochenmark fanden sich Medianwerte von 267,6 µg/g (Range: 532,7 µg/g; Ostim® plus 10) und 1294 µg/g (Range: 1298,3 µg/g; Ostim® plus 20).

Vier Wochen postoperativ lag bei allen fünf Tieren die Clindamycinkanzenzration in der Kortikalis und dem Knochenmark unter der Nachweisgrenze (0,2 µg/g).

Die Antibiotikumkanzenzration in der Ostim®-Paste betrug bei Ostim® plus 10 zwei Tage postoperativ im Median 2789,2 µg/g (Range: 9735,8 µg/g) und bei Ostim® plus 20 11984,8 µg/g (Range: 57960,8 µg/g), nach 14 Tagen 1294 µg/g (Range: 1298,3 µg/g) bzw. 2285,3 µg/g (Range: 4549,3 µg/g). Vier Wochen postoperativ war bei zwei von fünf Tieren noch eine geringe Clindamycinkanzenzration in der Prüfsubstanz nachweisbar (Median: 0,1 µg/g; Range: 8,5 µg/g).

#### **IV.5.2.2. Postoperative Clindamycinserumspiegel**

Diese folgten einer Log-Normalverteilung, sodass die geometrischen Mittel- bzw. Durchschnittswerte mit dazugehörigem 2s-Intervall ([ ]) aufgeführt werden (s. a. Material und Methoden – „Statistische Auswertung“, Seite 77).

Zwei Stunden nach Implantation von Ostim® plus 10/20 betrug die Konzenzration im geometrischen Mittel 0,943 µg/ml [0,319; 2,790] bzw. 1,062 µg/ml [0,371; 3,039] (p=0,645). Bis zur vierten Stunde kam es bei Ostim® plus 10 zu einem Anstieg auf einen durchschnittlichen Höchstwert von 1,036 µg/ml [0,317; 3,389]. Bei Ostim® plus 20 erreichte der Mittelwert acht Stunden postoperativ das Maximum mit 1,098 µg/ml [0,348; 3,465]. Danach fielen die Werte auf 0,316 µg/ml [0,081; 1,160] (Ostim® plus 10) bzw. 0,355 µg/ml [0,046; 2,762] 72 Stunden postoperativ ab (p=0,84761).

Während sich bei Ostim® plus 10 dieser Konzentrationsabfall kontinuierlich vollzog, war bei Ostim® plus 20 vom zweiten zum dritten postoperativen Tag ein erneuter Anstieg der Serumkonzentration um  $0,076 \mu\text{g/ml}$  von  $0,279 \mu\text{g/ml}$  [ $0,061$ ;  $1,266$ ] auf  $0,355 \mu\text{g/ml}$  [ $0,046$ ;  $2,762$ ] zu beobachten.

Die jeweiligen Höchstwerte der Versuchstiere betragen für Ostim® plus 10 im geometrischen Mittel  $1,109 \mu\text{g/ml}$  [ $0,325$ ;  $3,785$ ], für Ostim® plus 20  $1,297 \mu\text{g/ml}$  [ $0,454$ ;  $3,706$ ] ( $p=0,57535$ ).

Die paarweise Testung mit dem t-Test für unabhängige Stichproben ergibt zu keinem Messzeitpunkt Hinweise für Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit beträgt zwei Stunden postoperativ  $0,645$ , vier Stunden postoperativ  $0,84451$ , nach acht Stunden  $0,4799$ , nach 24 Stunden  $0,54994$ , bei 48 Stunden  $0,76933$  und nach 72 Stunden  $0,84761$ .

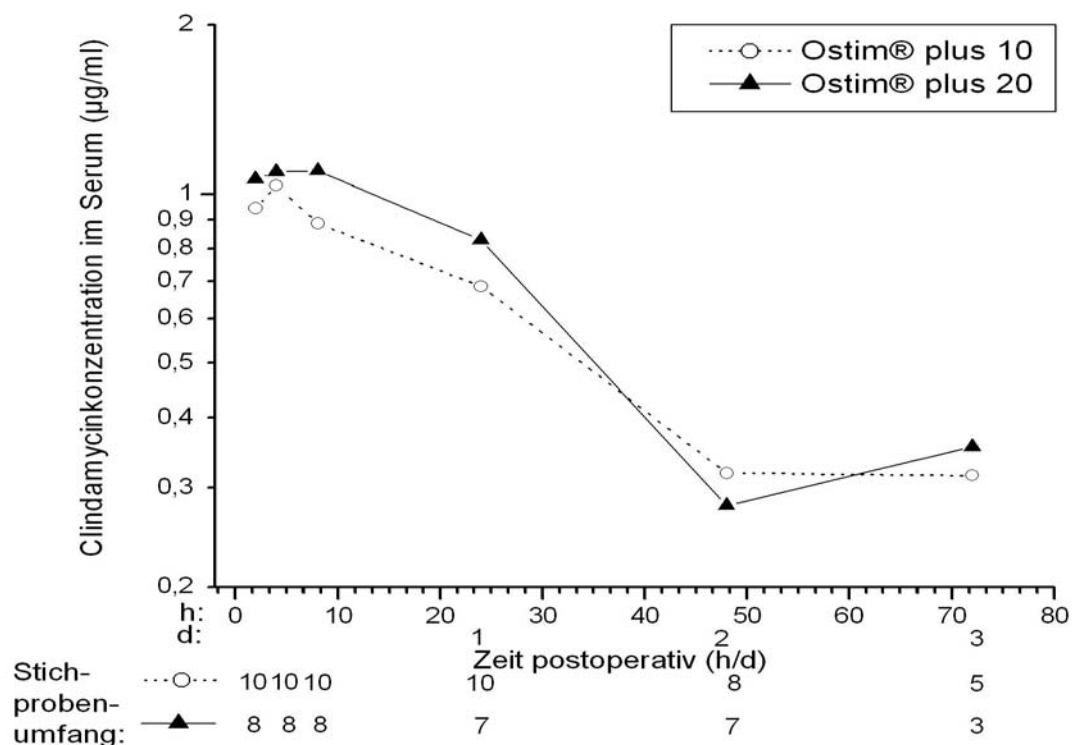


Abbildung 114: Postoperative Clindamycinkonzentrationen im Serum nach Implantation von ca. 1 g Ostim® plus 10/20 in den Femurmarkraum von 18 Kaninchen. Geometrische Mittelwerte. Keine Hinweise auf Unterschiede zwischen den Gruppen in der paarweisen Testung mittels t-Test. Zahlenwerte und 2s-Intervalle s. Anhang, Tabelle 11, Seite 206.

## **V. DISKUSSION**

Die knöcherne Integration sowie die In-vivo-Pharmakokinetik werden neben den Prüfsubstanzen selbst in nicht zu unterschätzendem Maße von den Bedingungen des Implantationsbettes (Turn-over, Stoffwechselaktivität, Durchblutung, pH-Wert, mechanische Verhältnisse u. a.) bedingt. Die Diskussion des angewandten Versuchsmodells ist deshalb für die Interpretation der hier gewonnen Ergebnisse unerlässlich.

### **V.1. Tier- und Operationsmodell**

Als Tiermodell wurde das Kaninchen gewählt, da es die kleinste Art ist, bei der die angewandte Operationsmethode noch standardisiert durchführbar ist. Einige Autoren bezweifeln die Eignung von Kaninchen für die Untersuchung mit osteogenetischer Fragestellung. Die im Vergleich zum Menschen höhere metabolische Aktivität (Culson, 1983) und größere appositionelle Knochenformationsrate (Frost, 1973) sind die wesentlichen Argumente dieser Diskussion (Mandelkow et al., 1990; Osborn, 1985; Röser et al., 1994; Schnettler, 1992).

Während eine Übertragung quantitativer osteogenetischer Ergebnisse auf die Humansituation sicherlich nicht ohne Einschränkungen möglich ist, kann das verwendete Versuchsmodell dennoch gute qualitative Aussagen zum Integrationsverhalten von Ostim® hinsichtlich Biokompatibilität, Integrationsmuster und Resorptionsverhalten liefern (Guenther et al., 1998). Die relativ weite Verbreitung des Kaninchens als Tiermodell in der Knochenersatzmaterialforschung erleichtert Vergleiche mit anderen Studien.

Für die Defektsetzung kam eine innengekühlte Diamanthohlfräse (*Diamond Bone Cutting System* – DBCS) zur Anwendung (Draenert und Draenert, 1987), um Hitze- nekrosen und mechanische Traumatisierungen zu minimieren (Schnettler, 1992) und um so ein möglichst vitales spongiöses Implantationsbett zu schaffen. Ein Drillbohrer würde im Gegensatz dazu in stärkerem Maße Mikrofrakturen, Spanbildungen und Hitzenekrosen hervorrufen.

Die hieraus resultierenden Heilungsprozesse könnten die physiologische Reaktion auf die Implantation der Prüfsubstanz überlagern und zu möglichen Fehlinterpretationen führen (s. a. Material und Methoden - "Diamond Bone Cutting System"; Seite 63).

Der Zugang zum Implantationsgebiet erfolgte über das knorpelige femoropatellare Gleitlager, um eine überschießende periostale Knochenneubildung zu umgehen.

Um Verfälschungen der Antibiotikumkonzentrationen durch die Synovialflüssigkeit zu vermeiden, wurden die entsprechenden Proben gelenkfern entnommen. Außerdem wurde der Implantationskanal durch Replantation des Knorpel-Knochen-Zylinders weitestgehend verschlossen.

Da Lincomycinantibiotika bei Kaninchen und Hamstern schwerwiegenden Störungen der Darmflora verursachen können, ist deren Anwendung bei diesen Arten nicht empfohlen (Nicholas, H. und McDonald, 1988). Die bekannt niedrigen systemischen Antibiotikumkonzentrationen nach lokaler Wirkstoffapplikation sowie die nebenwirkungsfreie Anwendung von Ostim® plus in einer Parallelstudie von REINLE (2005) waren die Gründe zur Beibehaltung dieses Tiermodells.

Von 18 Tieren mit clindamycinhaltigen Implantaten erkrankten acht letal an einer Diarrhö. Die postmortale Diagnostik zweier Tiere zeigte eine Dysbiose des Dick- und Dünndarmes mit Verdrängungen der physiologisch grampositiven Darmflora durch gramnegative *Escherichia coli* Bakterien. Eine zu beobachtende Splenomegalie, petechiale Darmwandblutungen und eine blaurot verfärbte Trachealschleimhaut sind in diesem Zusammenhang als Zeichen eines enterotoxischen Geschehens mit konsekutivem Kreislaufversagen zu werten (s. pathologischer Befundbericht, Seite 208).

Die Erkrankungsfälle sind aller Wahrscheinlichkeit nach auf die antibiotische Wirkung von Clindamycin zurückzuführen, die insbesondere im grampositiven Bereich ausgeprägt ist und die labile, grampositiv dominierte Darmflora von Kaninchen und Hamstern ungünstig beeinflusst.

Zu diesem Schluss kommen auch GRAY und LEWIS (1966), die einen ähnlichen klinischen Verlauf nach Anwendung von Lincomycin bei Kaninchen beobachteten. Das verwendete Tiermodell muss bezüglich der pharmakokinetischen Fragestellung deshalb rückblickend als nicht geeignet eingeschätzt werden.

Eine Übertragung der hier beobachteten Clindamycinwirkung auf die Humansituation wäre falsch, da der Mensch über eine stabilere und insbesondere gramnegativ dominierte Darmflora verfügt und gastrointestinale Nebenwirkungen deshalb in diesem Ausmaß nicht entstehen (Friedman et al., 1976; Tedesco et al., 1974). Vielmehr sind bei lokaler Clindamycinapplikation weniger Nebenwirkungen als bei der bisher üblichen systemischen Gabe zu erwarten (s. a. Diskussion – „Serumspiegel“, Seite 165).

Einen Anhalt für eine Ostim<sup>®</sup>-bedingte Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes besteht nicht, da die Vergleichsgruppe mit clindamycinfreien Implantaten nebenwirkungsfrei blieb. Dies beobachteten unabhängig voneinander auch REINLE (2003) und KILIAN et al. (2002) in tierexperimentellen Arbeiten mit Ostim<sup>®</sup>. Zahlreiche klinische Studien aus der Human- und Zahnmedizin berichten ebenfalls von einer guten Verträglichkeit.

PANKRATOV et al. (1995) setzten Ostim<sup>®</sup> in der Behandlung von 65 Patienten mit mandibulären Frakturen ein und beobachteten dabei im Vergleich zu herkömmlichen Behandlungsmethoden eine schnellere Frakturheilung sowie eine um 6,78% geringere klinische Komplikationsrate.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen ZUEV et al. (1996) in einer klinischen Studie mit 395 Periodontitispatienten.

In Kombination mit Lincomycin (Linco-HAP) erzielten DMITRIEVA et al. (1995) und BEZRUKOV et al. (1998) bei 380 bzw. 49 Studienteilnehmern gute klinische Ergebnisse ohne schwerwiegende Nebenwirkungen.

## **V.2. Knochenreaktion auf Ostim® in der Hellfeldmikroskopie**

### **V.2.1. Erschließungsmuster, Osteogenese und Biodegradation**

Die Prüfsubstanz erzielte eine formschlüssige und kompakte Auffüllung des Defektes. Größere Hohlräume oder Aussparung, die für eine knöcherne Heilung nachteilig und häufig Ausgangspunkt von Infektionen sind, waren nicht ausgebildet.

Die zelluläre und vaskuläre Erschließung des Implantates ging, ebenso wie die regenerativen Knochenneubildungen, vom Lagerknochen aus. Das in den Randbereichen schollig zerfallende Ostim® diente dabei den vorwachsenden Knochen trabekeln als Leitschiene im Sinne einer osteokonduktiven Osteogenese.

Übereinstimmend beobachteten LASCHKE et al. (2007) nach Ostim®-Implantation in eine dorsale Hautfalte bei Hamstern eine von peripher nach zentral – auf Regionen des Implantatabbaus gerichtete Neovaskularisierung in Form einer „*guided vaskularisation*“. Eine Osteokonduktion durch Ostim® wird auch von LAUER (2006), SMEETS et al. (2008) und THORWARTH et al. (2005) beschrieben.

Eine osteoblastische Osteogenese des Implantatzentrums, wie wir sie bei vaskularisierten autogenen Transplantaten mit vitalen Zellen beobachten können, fand bei dem zellfreien Ostim® erwartungsgemäß nicht statt. Die Knochenneubildung ist vielmehr auf Zellen aus dem Implantationsbett angewiesen.

Diese liegen entweder bereits als osteogenetisch aktive Zellen in Form von Osteoblasten oder Osteozyten im Knochen vor oder entwickeln sich aus Mesenchymzellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien. Im Einzelnen wird eine Entwicklung aus mesenchymalen Stammzellen (Ohgushi und Caplan, 1999), mesenchymalen Progenitorzellen (*mesenchymal progenitor cells*, MPC) (Minguell et al., 2000), determinierten und undeterminierten Osteoprogenitorzellen (*determined* und *inducible osteogenetic precursor cells*, DOPC und IOPC) (Asahina et al., 1993;



Kuznetsov et al., 2000; Owen, 1978; Reddi et al., 1987; Urist, DeLange et al., 1983) und fraglich auch aus Fibroblasten (Rutherford et al., 2002) beschrieben.

Einflussfaktoren auf die hierbei ablaufenden zellulären Differenzierungsprozesse sind physikalischer Natur; - Sauerstoffspannung, Mechanik, bioelektrische Potentiale u. a. - (Bassett und Herrmann, 1961) oder biologischen Ursprungs, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Zytokine, Mediatoren u. a.

Neben Induktionsstoffen, wie das von URIST et al. (1982) entdeckte und isolierte *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), unterscheidet man verschiedene Mitogene (FGF- $\beta$ , *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) etc.) und Stimulatoren (IGF u. a.) (s. a. Literaturüberblick – „Die Biologie des Knochenersatzes“, Seite 18).

LAUER (2006) bestätigte den Einfluss von Wachstumsfaktoren in Kombination mit Ostim<sup>®</sup> durch Zusatz von Plättchenreichem Plasma im Tiermodell. Dabei fand sich eine hoch signifikante Verstärkung der zellulären Antwort mit Zunahme der Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen, eine stärkere Knochenneubildung sowie ein beschleunigter Implantatabbau.

Inwieweit Ostim<sup>®</sup> durch freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{PO}_4^{3-}$ -Ionen an Differenzierungsprozessen mesenchymaler Zellen beteiligt ist und darüber eine osteoinduktive Wirkung entfaltet, kann mit der vorliegenden Untersuchung nicht beurteilt werden.

MA, S. et al. (2005) untersuchten das Lösungsverhalten von Hydroxylapatitbeschichtungen und dessen Einfluss auf die Differenzierung von embryonalen Mesenchymzellen zu Osteoblasten. Unter zusätzlicher Anreicherung der Zellkulturen mit Calciumionen war dabei eine vermehrte Ausbildung von Osteoblasten zu beobachten. Zusätzliche anorganische Phosphorionen behinderten hingegen diese Zelldifferenzierung. Eine Beeinflussung der osteogenetischen Zelldifferenzierungsprozesse durch Calcium- und Phosphationen kann somit angenommen werden.

Exakte Aussagen zur osteogenetischen Potenz der Prüfsubstanz kann die vorliegende Arbeit auf Grund einer fehlenden Kontrollgruppe mit einem Leerdefekt nicht treffen.

Wie die fluoreszenzoptischen Untersuchungen zeigten, war bei den clindamycinfreien Implantaten eine reparative Knochenneubildung bereits vor dem siebten postoperativen Tag regelhaft nachweisbar. Eine nahezu vollständige knöcherne Durchbauung des Defekts mit einem Durchmesser von ca. 4,5 mm zeigte sich vier Wochen postoperativ bei zwei von vier Tieren.

Für Endobon<sup>®</sup>, im Gegensatz zu Ostim<sup>®</sup> eine nicht resorbierbare Hydroxylapatitkeramik, ist bei weitestgehend übereinstimmendem Versuchsmodell eine beginnende knöcherne Heilung nach sechs Wochen und eine nahezu vollständige knöcherne Integration nach drei Monaten beschrieben (Dingeldein et al., 1994). In diesem Fall weist Ostim<sup>®</sup> eindeutig eine stärkere Knochenneubildung auf. Zuverlässige Vergleiche mit anderen Materialien sind auf Grund der stark variierenden Operations- und Tiermodelle jedoch nicht möglich.

HUBER et al. (2008) führten eine vergleichende tierexperimentelle Studie an 32 Kaninchen mit ulnaren *Critical-Size*-Defekten und Implantation von Ostim<sup>®</sup>, Cerabone<sup>®</sup> (einer bovinen Tricalciumphosphatkeramik), Cerabone<sup>®</sup>+Ostim<sup>®</sup> und einer Kontrollgruppe (Leerdefekt) durch. Histomorphometrisch wies die Ostim<sup>®</sup>-Gruppe nach einem achtwöchigen Follow-Up die beste mediane Knochenfläche (41%) auf. Bei Ostim<sup>®</sup>+Cerabone<sup>®</sup> betrug diese 36%, bei Cerabone<sup>®</sup> 26% und beim Leerdefekt 16%. Die knöcherne Erschließung der Tricalciumkeramik verbesserte sich unter Zusatz von Ostim<sup>®</sup>. Ohne Zusatz wurden median 55% der Porenfläche mit Knochen gefüllt, bei Cerabone<sup>®</sup>+Ostim<sup>®</sup> erhöhte sich dies auf 77%.

CARMAGNOLA et al. (2008) untersuchten am Bohrlochmodell der Tibia bei zehn Kaninchen die knöcherne Integration von Titanimplantaten. Diese wurden nach sechswöchiger Vorbehandlung mit Ostim<sup>®</sup>, Bio-Oss<sup>®</sup> oder Perioglass<sup>®</sup> in Kombination mit einer Kollagenmembran sowie ohne vorherigen Einsatz von Knochenersatzmaterialien implantiert. Das Inkorporationsverhalten wurde nach weiteren sechs Wochen evaluiert. Die drei Substanzen zeigten dabei im Vergleich zum Leerdefekt eine stärkere Knochenneubildung. Vor dem Hintergrund eines sehr geringen Stichprobenumfangs konnte jedoch weder eine signifikante Verbesserung der Osteointegration der Implantate noch wesentliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Materialien nachgewiesen werden.

Am Schweinmodell wies Ostim<sup>®</sup> und Ostim<sup>®</sup> mit Zusatz von 25% autologem Knochen nach drei Monaten eine unwesentlich geringere Mineralisation auf als autologes Transplantat (Thorwarth et al., 2005). Mikroradiographisch betrugen die Mineralisationsgrade 57,1% für das Autotransplantat, 53,9% für Ostim<sup>®</sup> und 60,2% bei Ostim<sup>®</sup> mit Autotransplantatzusatz.

Eine vergleichende klinische Studie von Ostim<sup>®</sup> und Bio-Oss<sup>®</sup> (bovines Xenograft) in Kombination mit einer Kollagenmembran (Bio-Gide<sup>®</sup>) bei der Therapie knöcherner periimplantitischer Defekte in der Oralchirurgie (Schwarz et al., 2006) beschreibt nach sechs Monaten für beide Gruppen eine radiologisch dokumentierte knöcherne Defektdurchbauung. Auf Grund einer geringen Propandenzahl von 22 sowie einer lediglich nativradiologischen Beurteilung der Knochenstruktur sind signifikante Aussagen über die osteogene Aktivität der Gruppen nicht möglich. Im Zwei-Jahres-Follow-Up zeigten sich jedoch klinische Vorteile für die Gruppe Bio-Oss<sup>®</sup>+Bio-Gide<sup>®</sup> (Schwarz et al., 2008).

Die Biodegradation des Implantates erfolgte angepasst an die Knochenneubildungen. Während Knochenneubildungszonen einen vollständigen Implantatabbau aufwiesen, enthielten Regionen ohne bzw. mit geringer Osteogenese kompakte bzw. geringfügig aufgelockerte Materialansammlungen.

LAUER (2006) berichtet bei ähnlichem Versuchsmodell am Minipig nach 20 Tagen ebenfalls über eine Auflockerung und einen Abbau von Ostim<sup>®</sup> in den durch Osteoneogenese gekennzeichneten Randbereichen. Im Defektzentrum war weder Implantat noch Regenerationsgewebe nachweisbar. Ursächlich wird hier der Eintritt von Synovialflüssigkeit in das Implantationsbett mit nachfolgender Hydrolyse des Knochenersatzmaterials vermutet. Im Gegensatz zur eigenen Untersuchung wurde ein spezialangefertigter Kunststoffdeckel zum Verschluss des Bohrlochdefektes verwendet. Histologisch, immunhistochemisch und elektronenmikroskopisch stellte sich der Implantatabbau als Kombination aus Hydrolyse und Phagozytose durch Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen dar.

Ebenfalls am Schweinmodell beobachteten THORWART et al. (2005) nach zwölf Wochen einen kompletten Abbau von Ostim®. SPIESS et al. (2008) stellten hingegen nach sechs Wochen keinen weiteren Abbau sondern eine knöcherne Integration sowie ein Implantatnachweis ein Jahr postoperativ fest.

Für die Humansituation berichteten HUBER et al. (2006a) nach Implantation in traumatische Substanzdefekte von Tibia-, Kalkaneus- und distalen Radiusfrakturen bei medianer Nachbeobachtungszeit von 13 Monaten über einen weitestgehenden Abbau des Implantates, wobei Reste insbesondere im Markraum zu finden waren.

Für die Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie beobachteten STRIETZEL et al. (2007) bei Anwendung im Rahmen eines lateralen Kieferaufbaus nach sechs- bis siebenmonatiger Implantationszeit ebenfalls einen weitestgehenden Abbau. SMEETS et al. (2008) berichten in einem Case-Report über eine Patientin, die drei Jahre nach Sinusbodenanhebung und Auffüllung des Sinus mit Ostim® ein Zahnimplantat erhielt. Die dabei entnommenen Proben wiesen Implantatreste auf, die größtenteils von Geflecht- und zum Teil von Lamellenknochen umgeben waren.

Hydroxylapatitkeramiken sind im Gegensatz hierzu auf Grund kristallographischer Veränderungen während der Sinterung weitestgehend resorptionsstabil (Liebendörfer und Troster, 1997; Osborn und Newesely, 1980; Yuasa et al., 2001; Yubao, Klein, De Wijn et al., 1994). Neuere Calciumphosphatzemente (Knaack et al., 1998; Sarkar et al., 2001) und HA-Kollagen-Komposite (Chappard, Fressonnet et al., 1993; Chappard, Zhioua et al., 1993) zeigen gegenüber den HA-Keramiken eine bessere Biodegradation. Diese bleibt jedoch weiterhin inkomplett (Chappard, Fressonnet et al., 1993; Chappard, Zhioua et al., 1993; Clokie et al., 2002; Constantz et al., 1998; Knaack et al., 1998; Sarkar et al., 2001) (s. a. Literaturüberblick – „Möglichkeiten des Knochenersatzes“, Seite 27).

Ein an die Knochenneubildung zeitlich angepasster Implantatabbau bietet den Vorteil, dass die Defektregion vollständig mit körpereigenem Knochengewebe durchbaut werden kann und dieses im Rahmen des osteoklastären Remodellings an die biomechanischen Erfordernisse angepasst werden kann.

Hydroxylapatitkeramiken entziehen sich als weitestgehend resorptionsstabile osteoimplantäre Verbunde dem osteoklastären Remodelling. Eine Anpassung an die biomechanischen Erfordernisse der Defektregion ist deshalb nur sehr bedingt möglich (Guenther et al., 1998).

### **V.2.2. Zelluläres Reaktionsmuster**

Die Durchsetzung der Implantatmassen mit Makrophagen kann zum einen im Rahmen einer physiologischen Gewebereaktion auf das stattgehabte Operationstrauma (Goldberg, V. M. et al., 1987; Goldberg, V. M. und Stevenson, 1987; Reddi et al., 1987), zum anderen als chemotaktische Makrophagenmigration durch das eingebrachte Implantat interpretiert werden (Chambers, 1981).

LAUER (2006) verzeichnete bei ähnlichem Versuchsaufbau beim Minipig 20 Tage postoperativ nur in der Ostim<sup>®</sup>-Gruppe eine Durchsetzung mit Makrophagen, nicht jedoch beim Leerdefekt. Somit ist von einer Förderung der Makrophagenpopulation durch Ostim<sup>®</sup> auszugehen.

CHAMPAGNE et al. (2002) beobachteten für humane Makrophagen eine osteoinduktive Wirkung in Mesenchymstammzellkulturen durch Produktion von BMP-2 und BMP-6. Andererseits sind sie im Rahmen von chronischen Entzündungen (Tani-Ishii et al., 1995) oder Fremdkörperreaktionen (Ingham et al., 2000; Jiranek et al., 1993; Wright und Goodman, 1996) an osteolytischen Prozessen durch die Produktion von IL-1 und TNF- $\alpha$  beteiligt. Ihnen kommt somit eine zentrale Bedeutung bei knöchernen Heilungsprozessen zu.

Eine direkte Auflagerung von Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen auf Ostim<sup>®</sup>-Oberflächen beobachtete auch LAUER (2006) in der bereits erwähnten tierexperimentellen Arbeit. Histologische, immunhistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben einen Implantatabbau durch diese Zellen, unterstützt von einer Hydrolyse. Hinweise für eine Beteiligung von Osteoklasten ergaben sich nach 20-tägiger Implantationszeit nicht.

HUBER et al. (2006a) beschrieben in ihrer immunhistologischen Studie aus der Humansituation ebenfalls Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen vom ungeordneten Typ auf Ostim®-Oberflächen und vermuten eine Beteiligung der Zellen am Implantatabbau. STRIETZEL et al. (2007) beobachteten multinukleäre Riesenzellen in der Nähe von Ostim®-Resten sechs Monate nach Kieferaugmentation beim Menschen. CHRIS ARTS et al. (2006) sahen anhand von Färbungen mit tartratresistenter saurer Phosphatase Hinweise für eine aktive osteoklastäre Resorption.

MÜLLER-MAI et al. (1995) identifizierten in licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen verschiedene Riesenzellentypen auf nanopartikulären Hydroxylapatitoberflächen und charakterisierten den Abbau als Kombination aus Lösung und Biodegradation durch Osteoklasten-ähnliche Zellen.

Eine Beteiligung von Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen und Osteoklasten an Degradationsprozessen ist auch für Hydroxylapatitkeramiken (Basle et al., 1993; Daculsi, Passuti et al., 1990; Dingeldein et al., 1994; LeGeros, 1993; Taylor et al., 2002; Yamada et al., 1997), Calciumphosphatzemente (Frankenburg et al., 1998; Knaack et al., 1998; Sarkar et al., 2001) und HA-Kollagen-Komposite (Chappard, Fressonnet et al., 1993; Chappard, Zhioua et al., 1993) mehrfach belegt.

Die über den gesamten Nachbeobachtungszeitraum bestehende geringgradig ausgeprägte granulozytäre Reaktion im Implantationsgebiet ist vermutlich nicht alleinig als Reaktion auf das Operationstrauma, sondern auch als leichtgradige implantatvermittelte Reaktion zu sehen. Da Granulozyten einerseits durch mediatorvermittelte Migration, Proliferation und fibrovaskuläre Differenzierung von Mesenchymzellen fördernd auf Heilungsprozesse einwirken können (Goldberg, V. M. et al., 1987; Goldberg, V. M. und Stevenson, 1987; Heiple et al., 1987; Reddi et al., 1987), andererseits mit einer verminderten osteoblastären und erhöhten osteoklastären Aktivität in Zusammenhang gebracht werden (Kitamura et al., 1995; Soshi et al., 1996; Tani-Ishii et al., 1995), ist unklar wie diese zu bewerten ist.

LAUER (2006) stellte nach 20-tägiger Implantation keine granulozytäre Reaktion fest. In der oben angeführten human-histologischen Studie von HUBER et al. (2006a) waren nach median 13 Monaten ebenfalls keine Granulozyten nachweisbar. Inwieweit diesbezüglich die Ergebnisse divergieren oder dies Ausdruck einer rasch abklingenden entzündlichen Begleitreaktion ist, kann letztlich nicht sicher beantwortet werden. In der vorliegenden Untersuchung war diese zumindest vom 14. zum 28. postoperativen Tag rückläufig.

Abgesehen von einer oberflächlichen eitrigen Wundinfektion eines Tieres (dritter bis achter postoperativer Tag) gab es in unserer Untersuchung keine Wundheilungsstörungen (Gelenkergüssen, Serombildungen oder ähnliches).

In den meisten klinischen Studien mit Ostim® in der Humanmedizin wurde ebenso keine Häufung von Weichteil- oder Wundinfekten beobachtet (Gerlach und Niehuses, 2007a; Heinz und S., 2006; Huber et al., 2006a; Huber et al., 2006b; Huber et al., 2006c; Huber et al., 2006d; Kasaj et al., 2008; Smeets et al., 2008; Strietzel et al., 2007).

SCHWARZ et al. (2008) fanden im Zwei-Jahres-Follow-Up von 22 Patienten mit periimplantitischen Knochendefekten und Behandlung mit Ostim® im Vergleich mit Bio-Oss®+Bio-Gide® klinische Vorteile für die zweite Gruppe. Zwei Patienten der Ostim®-Gruppe wurden wegen starker eitriger Wundinfektion nach zwölf Monaten aus der Studie ausgeschlossen.

Über leichte entzündliche Reaktionen nach ossärer Implantation von Hydroxylapatitkeramiken über einen Zeitraum von sechs Wochen berichteten LEHTINNEN et al. (1990) sowie RÖSER et al. (1994). KLINGE et al. (1992) beschrieben diese für eine Nachbeobachtungszeit von 14 Tagen und BUTTS et al. (1989) für einen Zeitraum von zehn Tagen.



### V.2.3. Fasermatrix

Die in der vorliegenden Untersuchung aufgetretene parallel strukturierte Fasermatrix war überwiegend in Geflechtknochenneubildungszonen ausgebildet und war hier mit Osteoblasten und ovalkernigen Zellen durchsetzt. Die Fasern gingen mit zunehmender Blaufärbung in neu gebildete Knochentrabekel über.

Insgesamt ist anzunehmen, dass es sich hierbei um eine Kollagenfasermatrix im Rahmen der Osteoneogenese handelt. Die ungefärbten Bereiche könnten Kollagenansammlungen mit noch fehlender amorpher Grundsubstanz entsprechen, während es in den blau gefärbten Regionen zu einer zunehmenden Osteoideinlagerung kommt.

Über Osteoideinlagerungen in fibröses Gewebe berichteten auch CULLUM et al. (1998) nach maxillärer Implantation von Hydroxylapatitkeramiken (Calcite<sup>®</sup> 20-40) bei Hunden (acht Wochen postoperativ). Nach 30 Wochen war das Bindegewebe vollständig durch Knochengewebe mit direktem Keramikkontakt ersetzt.

Neben Osteoblasten fanden sich ovalkernige Zellen, die Mesenchymzellen mit osteogenetischem Differenzierungspotential, Präosteoblasten, Osteoprogenitorzellen sowie Fibroblasten entsprechen können. Eine hellfeldmikroskopische Differenzierung der Zellen ist auf Grund der starken morphologischen Ähnlichkeit nicht sicher möglich.

Immunhistochemische Untersuchungen von HUBER et al. (2006a) wiesen nach median 13-monatiger Implantation beim Menschen nur wenige Fibroblasten und zahlreiche Osteoblasten mit direkter Ablagerung von Osteoid auf Ostim<sup>®</sup>-Partikeln nach, wie dies auch in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde. STRIETZEL et al. (2007) beschreiben in der Humansituation ebenfalls Osteoblasten-ähnliche Zellen mit direktem Kontakt zu Ostim<sup>®</sup>. Demnach kann vermutet werden, dass die ovalkernigen Zellen Osteoblasten bzw. deren Vorläuferzellen entsprechen.

Sollte es sich um Fibroblasten handeln, so wäre die These der beschriebenen Kollagenfasermatrix als Vorstufe von Geflechtknochenneubildungen nicht unstimmig. Fibroblasten sind ebenso wie Osteoblasten zur Synthese von Typ I-Kollagen, dem Hauptkollagen des Knochens, fähig. Des Weiteren zeigte eine In-vivo-Untersuchungen von RUTHERFORD et al. (2002) eine Knochenneubildung durch Fibroblasten nach Transduktion mit BMP-7-produzierenden Adenoviren.

Von dieser osteogenen Fasermatrix sind vereinzelte bindegewebige Implantatauflagerungen mit Fibrozyten bei den clindamycinhaltigen Gruppen 3 und 4 abzugrenzen. Auf Grund des andersartigen histologischen Erscheinungsbildes und der fehlenden Assoziation mit Knochenneubildungsprozessen ist hier von einer geringgradigen bindegewebigen Reaktion auszugehen. Membranöse Strukturen mit einer Behinderung der zellulären oder vaskulären Implantaterschließung waren nicht ausgebildet. Ursächlich sind eine Abwehrreaktion des Organismus auf das eingebrachte Ostim<sup>®</sup> plus sowie eventuelle Mikrobewegungen bei fehlender Ruhigstellung zu diskutieren (Butts et al., 1989; Chang, C.-S. et al., 1983; Chang, R. C. und Kao, 2000; Cullum et al., 1988; Frame et al., 1987; Lehtinen et al., 1990; Liebendörfer und Tröster, 1997; Siebert et al., 1986; Uchida et al., 1984).

Nach Implantation von reinem Ostim<sup>®</sup> fanden sich auch in anderen immunhistochemischen und histologischen Studien nur geringe Fibrozytenzahlen und keine wesentliche bindegewebige Reaktion (Huber et al., 2006a; Huber et al., 2008; Strietzel et al., 2007). In einer tierexperimentellen immunhistochemischen Untersuchung wies der Leerdefekt eine deutlich größere Anzahl an Fibroblasten auf, als das mit Ostim<sup>®</sup> aufgefüllte Implantationsbett (Lauer, 2006).

Bindegewebige Reaktionen nach Implantation von Hydroxylapatitkeramiken wurden dagegen vielfach beobachtet. Histologische Untersuchungen von LIEBENDÖRFER und TRÖSTER (1997) mit einer bovinen Hydroxylapatitkeramik (Endobon<sup>®</sup>) zeigten in der Humansituation für fünf von 23 Fällen eine komplette bindegewebige Umscheidung der Implantate.

Insgesamt ist die in unserer Untersuchung aufgetretene bindegewebige Reaktion nach Implantation von Ostim<sup>®</sup> plus als sehr gering einzustufen.

#### V.2.4. Färbeverhalten

In der Toluidinfärbung ließen sich zwei unterschiedliche Färbephänomene für Ostim® und Ostim® plus erkennen.

Beide Implantate wiesen in osteogenetisch aktiven Bereichen eine homogene Färbung im Farbton des angrenzenden Geflechtknochens auf. Sowohl die Intensität als auch die Flächenausdehnung dieser Markierung korrelierten positiv mit der Stärke der benachbarten Knochenneubildung.

Möglicherweise ist dieses Färbeverhalten auf die Adsorption von amorphen Grundsubstanzen, wie Mukopolysacchariden, Proteoglykanen u. a. zurückzuführen. Diese binden bekanntermaßen über basophile Gruppen an Toluidin. Eine Adsorption von Proteinen und Polymeren auf Hydroxylapatitoberflächen beobachteten auch DIELERT et al. (1988), HLADY und FURDI-MILHOFER (1978) sowie MISRA (1991).

Über die Anfärbung von Hydroxylapatitpulver durch Toluidin berichtete OSBORN (1985). Unmittelbar postoperativ zeigte sich eine homogene Markierung, welche nachfolgend von peripher nach zentral abblasste. Der Autor interpretierte dies mit einer initialen Durchdringung der Pulvermassen mit organischer Matrix im Rahmen der postoperativen Inflamationsphase und einem anschließenden, peripher beginnenden, enzymatischen Abbau.

Bei kompakten und spongiösen Hydroxylapatitkeramiken ist eine Toluidinanfärbung bisher nicht beschrieben worden. Ursächlich hierfür könnte die deutlich geringere spezifische Oberfläche dieser Präparate im Vergleich zu Ostim® sein (Dreher, 2001).

Durch den feinkristallinen Charakter besitzt Ostim® eine spezifische Oberfläche von  $106 \text{ m}^2/\text{g}$  (Yubao, Klein, De Wijn et al., 1994). Zum Vergleich verfügen Hydroxylapatitkeramiken auf Grund von Kristallkonglomeration und -verschmelzung während des Sinterungsprozesses (Joschek et al., 2000) über spezifische Oberflächen zwischen  $0,1 \text{ m}^2/\text{g}$  (Kurioka et al., 1999) und  $0,04\text{-}0,07 \text{ m}^2/\text{g}$  (Kurioka et al., 1999).

Neben diesem Färbeverhalten wies Ostim<sup>®</sup> plus im Implantatzentrum schwach gefärbte Ostim<sup>®</sup>-Globuli auf. Diese waren diffus in der ungefärbten kompakten Implantatmasse verteilt. Ein örtlicher Zusammenhang zu Knochenneubildungen oder sonstigen Prozessen war nicht zu erkennen. Möglicherweise kam das veränderte Färbeverhalten durch eine Reaktion zwischen Clindamycin und Ostim<sup>®</sup> bzw. Toluidin zustande. Letztlich bleibt dies jedoch unklar und sollte in weiteren Untersuchungen abgeklärt werden.

### **V.2.5. Unterschiede zwischen Ostim<sup>®</sup> und Ostim<sup>®</sup> plus**

Die Gruppen 1 und 2 (Ostim<sup>®</sup>) wiesen gegenüber den clindamycinhaltigen Vergleichsgruppen ein makroskopisch feinkristallineres Implantat sowie eine frühere und stärkere Ausbildung der zellulär-vaskulären Heilungsprozesse und Osteogenese auf. Ursächlich ist sicherlich der reduzierte Allgemeinzustand Tiere auf Grund der aufgetretenen gastrointestinalen Nebenwirkungen (mit-)verantwortlich. Es stellt sich aber die Frage, inwieweit Clindamycin direkt oder durch chemisch-physikalischen Veränderungen des Ostim<sup>®</sup> die biologischen Prozesse im Implantationsbett zusätzlich hemmt.

Negative Einflüsse von Antibiotika auf Heilungsprozesse sind mehrfach beschrieben. Eine vergleichende histologische Studie an Kaninchen zeigte nach femuraler Implantation von Calciumsulfat+Ostim<sup>®</sup> unter Zusatz von Clindamycin, Gentamycin oder Vancomycin für die Clindamycingruppe eine deutlich geringere Knochenneubildungsrate, stärkere degenerative Veränderungen des Knochenmarks sowie eine schwächere zelluläre Implantaterschließung (Reinle, 2005).

YU et al. (1999) untersuchten die Auswirkungen von Clindamycin, Oxacillin, Tetracyclin und Chloramphenicol auf die Aktinproduktion von Myofibroblasten in vitro. Unter systemtherapeutischen Konzentrationen trat dabei eine Reduktion der Syntheseleistung auf 78,4%, 62,5%, 61,7% bzw. 26,1% des Vergleichswertes auf.

Für Gentamycin beobachteten ISEFUKU et al. (2003) in vitro bei Konzentrationen, wie sie bei lokaler Applikation auftreten (ab 100 µg/ml), eine signifikante Proliferationshemmung von Osteoblasten in vitro.

In-vivo-Untersuchungen von ROGERS-FOY et al. (1999) konnten hingegen bei Hydroxylapatitkeramiken mit und ohne Gentamycinsulfatzusatz keine signifikanten Unterschiede bezüglich der histologischen Reaktion und Knochenneubildungsrate zeigen.

MICLAU et al. (1995) untersuchten den Effekt von Tobramycin auf humane osteoblasten-ähnliche Osteosarkomzellen (MG-63) sowie Rattenosteoblasten in der Zellkultur. Bei Konzentrationen bis 200 µg/ml zeigte sich keine oder eine geringe Beeinflussung der Zellreplikationsrate (3H-Thymidin-Messung). Ab 400 µg/ml trat eine signifikante Proliferationshemmung und über 10000 µg/ml der Zelltod ein.

LINDSEY et al. (1993) beobachteten nach Implantation von tobramycinbeladenen spongiösen Autografts keine signifikante Hemmung der Osteogenese gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Antibiotikum.

CHANG, C. Y. et al. (2000) verglichen tierexperimentell die Knochenregeneration bei Einsatz von biodegradiblen Membranen mit und ohne Doxycyclinzusatz (25%) und beobachteten unter Doxycyclin eine signifikant höhere Knochenneubildungsrate.

Insgesamt kann eine dosisabhängige Hemmung der Osteogenese durch Clindamycin angenommen werden. Genauere Aussagen über deren Ausmaß und vergleichende Betrachtungen mit anderen Antibiotika können weder aus der vorliegenden Untersuchung noch aus den derzeit zu Verfügung stehenden Arbeiten anderer Autoren getroffen werden.

Für die These einer zusätzlichen chemisch-physikalischen Interaktion von Clindamycin mit dem Implantat spricht die aufgetretene grobkörnige Veränderung der Implantatstruktur von Ostim® plus.

LIU, Q. et al. (1998) beobachteten bei nanokristallinen Hydroxylapatitkristallen nach Zugabe von Polyethylenglykol eine verstärkte Aggregation. Infrarotspektrophotometrische Untersuchungen wiesen Urethanbindungen zwischen den Hydroxylgruppen der Kristalloberflächen und Isocyanatgruppen des Glykols nach. Die Einzelkristalle behielten dabei ihre Form- und Größenverhältnisse.

Auf die Bedeutung von reaktionsfähigen Hydroxylgruppen auf Hydroxylapatitoberflächen wiesen LABELLA et al. (1994), NISHIZAWA et al. (1995) sowie YESINOWSKI und ECKERT (1987) hin.

Eine Bindung oder Adsorption von Clindamycin an Ostim®-Kristalle könnte zu veränderten physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften führen. Inwieweit dies tatsächlich Einfluss auf die Heilungsdynamik und die Implantatdegradation nimmt, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen.

### **V.3. Fluoreszenzoptische Ergebnisse**

Die polychrome Fluoreszenzmarkierung mit Calceingrün und Alizarinkomplexon bestätigte das bereits hellfeldmikroskopisch beobachtete, vom Lagerknochen nach zentral fortschreitende Heilungsmuster. Zahlreiche Untersuchungen fanden für andere zellfreie Knochenersatzmaterialien ein entsprechendes Integrationsverhalten (Burchardt, 1983; Goldberg, V. M. und Stevenson, 1993; Heiple et al., 1987; Schnettler, 1992; Schnettler et al., 1994).

Die zeitlich verzögerte Heilungsdynamik der clindamycinhaltigen Implantate spiegelte sich auch fluoreszenzoptisch wieder. So begann eine trabekuläre Geflechtknochenneubildungen bei Ostim® noch vor dem siebten postoperativen Tag, während diese bei Ostim® plus im Zeitraum zwischen dem siebten und 21. postoperativen Tag stattfand. Die Ausbildung von Lamellenknochen mit trabekelumgebenden Alizarindoppelbanden fand sich ebenfalls nur in Gruppe 2.

Die in osteogenetisch aktiven Bereichen aufgetretene Fluorochrommarkierung des Ostim® korrelierte bezüglich Lokalisation, Intensität und Fläche positiv mit der osteogenetischen Aktivität. Kausal kann sowohl eine unspezifische Bindung der Farbstoffe an die calciumreiche Implantatoberfläche als auch eine Komplexbindung im Rahmen von Mineralisationsprozessen diskutiert werden.

Im ersteren Fall bliebe zu klären, ob die beobachtete Assoziation der Färbung mit stoffwechselaktiven Zonen allein durch einen stärkeren Antransport der Fluorochrome erklärbar ist.

Für die These einer implantatassoziierten Mineralisation spricht die ebenfalls in osteogenetisch aktiven Zonen vorkommende Fasermatrix sprechen. Nach der *Nanospace Theory* von KATSURA (1990) entstehen Hydroxylapatitkristalle in sog. Räumen von kritischer Größe, einem sog. *critical space* von ca. 6 nm Durchmesser. In diesen herrschen folgende, für die Entstehung von Hydroxylapatitkristallen erforderlichen Bedingungen:

- Elimination von Makromolekülen, welche die Kristallisation behindern
- Anreicherung und Übersättigung relevanter Ionen (insbes.  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$ )
- Lokale Restriktion von Molekularbewegungen

Im Rahmen von Knochenneubildungen entstehen solche Nanoräume zwischen Kollagenfibrillen, interfibrillär, sowie zwischen Kollagenfilamentaggregationen, intrafibrillär (Katsura, 1990).

Hochauflösende rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen von DIELERT et al. (1988) wiesen an Hydroxylapatitkeramiken anhaftende Kollagenfasern nach und hoben ebenfalls deren Bedeutung für ein epitaxiales Kristallwachstum hervor. Die hellfeldmikroskopisch beobachteten Fasern aus den osteogenetisch aktiven Bereichen könnten nach Adsorption an Implantatoberflächen solche Nanoräume geschaffen haben und in Verbindung mit einer durch Ostim® hervorgerufenen Anreicherung an  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{PO}_4^{3-}$ -Ionen Mineralisationsprozesse begünstigt haben.

Die Implantatfluoreszenz und die beschriebene Anfärbung durch Toluidin waren beide an osteogenetische Prozesse gekoppelt, ohne untereinander eine strenge Assoziation aufzuweisen. Da Mineralisationsprozesse und die Bildung amorpher Grundsubstanz wichtige Schritte einer Knochenbildung darstellen, aber nicht unmittelbar örtlich und zeitlich miteinander verbunden sein müssen, steht diese Beobachtung nicht im Widerspruch zur oben entwickelten These.

Die trabekelumgebenden Fluorochrombanden des spongiösen Lagerknochens sind als physiologische Knochenan- und -umbauprozesse zu werten und können als Hinweise für die Atoxizität von Ostim<sup>®</sup> für den umgebenden Lagerknochen gewertet werden.

#### **V.4. Klinische Anwendung**

Ostim<sup>®</sup> kommt als hochvisköse Paste in Fertigspritzen zu 1, 2, 5 und 10 ml, sowie einer 0,2 ml Injektionskartusche (*single dosage*) zur Anwendung. Defekthöhlen sind so auch über kleine Zugänge formschlüssig aufzufüllen, wie es die vorliegende Untersuchung zeigte.

Auf Grund der fehlenden Aushärtung von Ostim<sup>®</sup> erfordern instabile Defektverhältnisse zusätzliche Maßnahmen zur Gewährleistung einer ausreichenden Primärstabilität, um die Ausbildung von Binde- und Knorpelgewebe zu vermeiden (Vitalli, 1970). Inwieweit aushärtende Knochenersatzmaterialien allerdings einen Verzicht auf stabilisierende Maßnahmen ermöglichen können, ist noch unklar.

KOPYLOV et al. (1999) behandelten 40 Patienten mit instabiler distaler Radiusfraktur entweder mit einem aushärtenden Knochenzement (NSRS<sup>®</sup>) und einer zweiwöchigen Cast-Stabilisierung oder mit einer fünföchigen Ruhigstellung mittels Hoffmann-Bar. Die erste Gruppe wies nach sieben Wochen bessere funktionelle Ergebnisse auf. Nach drei Monaten bestanden keine signifikanten Unterschiede mehr, wobei in beiden Gruppen eine radiologisch dokumentierte Redislokation auftrat. Die Behandlung von sechs Patienten mit instabiler distaler Radiusfraktur mittels NSRS<sup>®</sup>-Knochenzement und zweiwöchiger Stabilisierung mit einem externen dorsalen Splint führten in fünf Fällen zu befriedigenden klinischen Ergebnissen.



Über gute klinische Ergebnisse in der Behandlung distaler Radiusfrakturen mit Ostim<sup>®</sup>-Applikation und Osteosynthese berichten HUBER et al. (2006b).

Mehrere klinische und zum Teil histologische Studien berichten über gute Ergebnisse bei der Anwendung von Ostim<sup>®</sup> bei der Behandlung knöcherner Frakturen, Knochenzysten, periimplantitischer und paradontotischer Knochendefekte, Sinusbodenanhebungen und anderer knochenrekonstruktiver Eingriffe (Gerlach und Niehuses, 2007b; Heinz und S., 2006; Huber et al., 2008; Huber et al., 2006d; Kasaj et al., 2008; Laschke et al., 2007; Strietzel et al., 2007).

In einer klinischen Studie mit 22 Patienten aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (Schwarz et al., 2006), bei der die Anwendung von Ostim<sup>®</sup> und Bio-Oss<sup>®</sup> (bovines Xenograft) in Kombination mit einer Kollagenmembran (Bio-Gide<sup>®</sup>) zur Therapie von knöchernen periimplantitischen Defekten verglichen wurde, war für die Ostim<sup>®</sup>-Gruppe eine initial verminderte Adhäsion des mukoperiostalen Flaps zu beobachten. Im Zwei-Jahres-Follow-Up ergaben sich klinisch leichte Vorteile für die Bio-Oss<sup>®</sup>+Bio-Gide<sup>®</sup>-Gruppe. Zwei Patienten aus der Ostim<sup>®</sup>-Gruppe wurden wegen starker eitriger Wundinfektion nach zwölf Monaten aus der Studie ausgeschlossen (Schwarz et al., 2008).

## **V.5. *Ostim<sup>®</sup> plus als resorbierbares Antibiotikum-trägersystem***

### **V.5.1. Auswahl von Clindamycin**

Die Auswahl eines Antibiotikums für die lokale antimikrobielle Therapie von Knocheninfektionen sollte nach folgenden Kriterien erfolgen:

- Wirkung gegen kausale Erreger von Ostitiden und Osteomyelitiden
- Wirkmechanismen gegen pathophysiologisch bedeutende Prozesse von Knochenentzündungen
- Gute Knochengängigkeit
- Geeignetes Diffusionsverhalten (Wasserlöslichkeit, Molekülgröße etc.)
- Geringe lokale und systemische Nebenwirkungen (keine negative Beeinflussung von Wund- und Knochenheilung, geringes allergisches Potential, günstiges systemisches Nebenwirkungsprofil)
- Chemische Stabilität bei Körpertemperatur und Anaerobie

Clindamycin zeichnet sich bereits bei systemischer Anwendung durch eine gute Wirkung gegen die wichtigsten Erreger von Osteomyelitiden, wie Streptokokken (Dan et al., 1997), Staphylokokken (Dan et al., 1997; Dingeldein, 1987; Klepser et al., 1997; Lemmen et al., 1993; Xue et al., 1996) einschließlich einigen oxacillin- und vancomycinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA) (Frank et al., 1999; Lemmen et al., 1993; Smith et al., 1988) sowie Pneumokokken (Klepser et al., 1997) aus. Empfindlich sind außerdem zahlreiche grampositive Anaerobier (s. a. Material und Methoden – „Clindamycin“, Seite 50).

Im Rahmen von Knocheninfektionen haben folgende pathophysiologische Vorgänge eine zentrale Bedeutung:

- Adhäsion von Bakterien an künstliche und natürliche Oberflächen (Prothesen, osteosynthetische Materialien, Knochen u. a.)
- Resistenzerhöhung durch die Produktion von Biofilmen (Anwar et al., 1992; Ceri et al., 1999) mit sekundärer Stoffwechselminimierung (*hybernating bacterias*) und Erhöhung der erforderlichen Minimalen Hemmkonzentration (Chuard et al., 1991; Ciampolini und Harding, 2000)

Clindamycin minimiert im subinhibitorischen Bereich, unabhängig von einer Reduktion der Erregerzahl, die Kolonisation von künstlichen und natürlichen Oberflächen durch *Staphylococcus aureus* (Doran und Rissing, 1983), (Mayberry-Carson et al., 1986) *Staphylococcus epidermidis* (Khardori et al., 1991) und *Pseudomonas aeruginosa* (Selan et al., 1989). Der Hemmung dieses pathophysiologischen Vorgangs kommt bei der Prophylaxe und Behandlung von ossären Infektionen eine zentrale Bedeutung zu. Insbesondere bei implantatassoziierten Knocheninfektionen spielt die Kolonisation von künstlichen Oberflächen durch gramnegative Staphylokokken, insbes. *Staphylococcus epidermidis*, eine entscheidende Rolle.

Nach erfolgter Adhäsion können Keime, wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli*, Mukopolysaccharide sezernieren und einen Biofilm ausbilden, durch den sie sich sowohl dem körpereigenen Immunsystem als auch der Wirkung von Antibiotika entziehen. In die extrazelluläre Glycokalyx eingebettete bakterielle  $\beta$ -Lactamasen können die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika erhöhen (Alam et al., 1990; Anwar et al., 1990; Anwar et al., 1992; Ceri et al., 1999; Costerton, 1999; Hudson et al., 1999; Lew und Waldvogel, 1997; Palmer und White, 1997; Schwank et al., 1998; Selan et al., 1989; Stewart und Costerton, 2001).

In tiefer gelegenen Glycokalyxschichten minimieren die Erreger auf Grund des reduzierten Sauerstoffangebots ihren Stoffwechsel und entziehen sich als sog. „schlafende Mikrokolonien“ (*hybernating bacterias*) antibakteriellen Substanzen. Insbesondere bakteriostatisch wirkende Antibiotika, die ihre Wirkung durch Einflussnahme auf den bakteriellen Stoffwechsel erzielen, sind hiervon betroffen.

Untersuchungen mit licht- und elektronenmikroskopischer sowie chromatographischer Methodik wiesen für Clindamycin eine Hemmung der Glycocalyxproduktion von *Staphylococcus aureus* (Mayberry-Carson et al., 1986), *Staphylococcus epidermidis* (Gismondo et al., 1990), *Pseudomonas aeruginosa* (Ichimiya et al., 1994), *Streptococcus viridans* (Dall et al., 1990) und *Bacteroides* spp. (Veringa et al., 1989) nach.

Arbeiten zum Wirkungsverlust verschiedener Antibiotika in Gegenwart von Biofilmen finden sich unter anderem bei SOULI und GIAMARELLOU (1998). Diese stellten Effektivitätsseinbussen von minimal 0,99% für Rifampicin, 15% für Clindamycin, 30% für Perfloxacin, 52% für Teicoplanin und 63% für Vancomycin fest. SELAN et al. (1989) verglichen diesbezüglich zahlreiche Antibiotika in Gegenwart von zehn grampositiven und sechs gramnegativen biofilmproduzierenden Erregern. Dabei erwies sich Clindamycin zusammen mit Ofloxacin als die am besten geeigneten Substanzen zur Prophylaxe von biofilmassoziierten Infektionen. Dennoch benötigte es in Untersuchungen von CERI et al. (1999) zur Eradikation von *Staphylococcus aureus*-Biofilmpopulationen (*minimal biofilm eradication concentration* - MBEC) eine 1000-fach höhere Konzentration wie zur Wachstumshemmung planktonischer Erreger.

Welchen Stellenwert die vorgestellten Wirkmechanismen des Clindamycins im Einzelnen bei Knocheninfektionen haben, lässt sich derzeit noch nicht beantworten. Zahlreiche tierexperimentelle und klinische Studien belegen jedoch die gute Eignung von Clindamycin zur Behandlung von Knocheninfektionen (Kaplan et al., 1982; Mader et al., 1989; Mader et al., 1999; Norden et al., 1986).

Derzeit werden überwiegend Antibiotikaträgersysteme mit Aminoglykosidzusatz, insbesondere Gentamycin (z. B. Septopal<sup>®</sup>, Septocol<sup>®</sup>) und Tobramycin (z. B. Osteoset-T<sup>®</sup>) verwendet. Daneben sind Systeme mit Teicoplanin (Targobone<sup>®</sup>) (Weis und Jansen, 1994) und Vancomycin (Winkler et al., 2000) in klinischem Gebrauch. Experimentelle Arbeiten beziehen sich darüber hinaus auf die lokale Therapie mit Penicillinen (Bowyer und Cumberland, 1994), Cephalosporinen (Bowyer und Cumberland, 1994; Yu et al., 1992; Zilch und Lambiris, 1986), verschiedenen Gyrasehemmern (Bowyer und Cumberland, 1994; DiMaio et al., 1994; Nie et al., 1998; Overbeck et al., 1995; Ramchandani und Robinson, 1998; Yu et al., 1992), Imipenem (Bowyer und Cumberland, 1994) und Fusidinsäure (Atkins und Gottlieb, 1999; Mackey et al., 1982).

Aminoglykoside sind gegen die meisten Erreger ossärer Infektionen, wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobakterien, und *Haemophilus influenzae* wirksam. Kaum empfindlich sind Enterokokken, Anaerobier, Pneumokokken sowie einige Streptokokken. Bei systemtherapeutischer Anwendung sind oto- und nephrotoxische Nebenwirkungen zu beachten, die jedoch unter lokaler Therapie mit Polymethylmethacrylat (PMMA) als Wirkstoffträger (Palacos<sup>®</sup>, Septopal<sup>®</sup>) zu keiner Einschränkung führen, wie zahlreiche Untersuchungen belegten (Grieben, 1981; Klemm, 2001; Klemm und Borner, 1986; Wahlig et al., 1978b; Walenkamp et al., 1998; Walenkamp und Vree, 1981; Walenkamp et al., 1986).

Tobramycin zeichnet sich durch eine breitere Wirkung gegen *Pseudomonas species* aus (Kahlmeter, 1979; Ristuccia und Cuhna, 1982).

Die Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin besitzen eine gute Aktivität gegenüber fast allen grampositiven Bakterien, insbesondere verschiedenen *Staphylococcus aureus*- und Enterokokkenstämme. Sie sind jedoch im gramnegativen Bereich größtenteils unwirksam. Da sie Reserveantibiotika gegen multiresistente Staphylokokkenstämme darstellen, sollte ein breiter, unkritischer Einsatz aus Gründen der Resistenzbildung vermieden werden.

Antibiotika der Penicillingruppe (Benzylpenicilline, Phenoxypenicilline, Aminobenzylpenicilline, Carboxypenicilline und Acylaminopenicilline) sowie Cephalosporine besitzen ein vergleichsweise hohes Risiko für allergische Reaktionen, was deren Einsatz für den implantativen Bereich limitiert (Golembiewski, 2002; Kelkar und Li, 2001; Macy, 2002; Mayorga et al., 2002; Miller, 2002; Primeau und Adkinson, 2002; Romano et al., 2002).

Die Knochengängigkeit von Clindamycin klassifizieren die meisten Autoren als gut bis sehr gut (Mader et al., 1989; Müller, S. C. et al., 1999; Nicholas, P. et al., 1975; Schurman et al., 1975; Stürmer et al., 1981; Summersgill et al., 1982); lediglich BOSELLI und ALLAOUCHICHE (1999) stufen diese als moderat ein. Bei lokaler Wirkstoffapplikation ist eine gute Knochengängigkeit mit einer guten Penetrationsfähigkeit des umgebenden Gewebes verbunden und deshalb vorteilhaft.

### **V.5.2. Clindamycingewebekonzentrationen**

Die Clindamycinkonzentration in der implantatumgebenden Kortikalis und dem angrenzenden Knochenmark überstieg innerhalb der ersten 14 Tage postoperativ bei elf von 13 Tieren bzw. 23 von 26 Messwerten die systemtherapeutische Resistenzgrenze (4 µg/g). Diese Grenze wurde von den meisten Werten deutlich überschritten.

Zwei Tage postoperativ überstieg die mediane kortikale Clindamycinkonzentration die systemtherapeutische Resistenzgrenze um das 294-Fache (Ostim® plus 10) bzw. das 431-Fache (Ostim® plus 20); im Knochenmark um den Faktor 12 bzw. 409. Zwei Wochen postoperativ betrug der Median in der Kortikalis das 31- (Ostim® plus 10) bzw. das 105-Fache (Ostim® plus 20), im Knochenmark das 20- bzw. 67-Fache der systemtherapeutischen Resistenzgrenze. Bei Versuchsende lag der Clindamycingehalt in beiden Kompartimenten bei allen Tieren unter der Nachweisgrenze (0,2 µg/g).

In der implantatumgebenden Kortikalis und dem angrenzenden Knochenmark wiesen zehn von 13 Tieren bzw. 22 von 26 Messwerten innerhalb der ersten zwei postoperativen Wochen bakteriostatische Konzentrationen für folgende osteomyelitisrelevanten Erreger auf (orientiert an den minimalen Hemmkonzentrationen von planktonisch vorliegenden Bakterien):

- Methicillinsensible *Staphylococcus aureus*
- Verschiedene Streptokokken (*S. pyogenes*, Serogruppe B, *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *Enterococcus species*)
- Verschiedene Enterobacteriaceae (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, bedingt *Serratia* und *Proteus*)
- Peptostreptokokken
- *Mycoplasma hominis*
- *Neisseria*
- Propionibakterien
- Bacteriodesarten (incl. *B. fragilis*)
- *Corynebacterium diphtheriae*
- Verschiedene Fusobakterien
- bedingt *Pseudomonas aeruginosa* und *Haemophilus influenzae* (uneinheitliche Literaturangaben)

Insbesondere die Angaben zur Sensibilität von *Staphylococcus epidermidis* stellen sich in der Literatur sehr uneinheitlich dar. MÜLLER et al. (1996) beobachteten eine minimale bakterizide Konzentration von 0,25 µg/ml. KORN und SHAH (1999) ermittelten dagegen eine minimale Hemmkonzentration (MHK 90) von 512 µg/ml.

Die minimale Hemmkonzentration für methicillinresistente *Staphylococcus aureus* geben LEMMEN et al. (1993) mit 32 µg/ml, KORN und SHAH (1999) mit >32 µg/ml an. Die erzielten kortikalen Konzentrationen von median 124,2 µg/g (Range: 180,6 µg/g; Ostim® plus 10) und 421,4 µg/g (Range: 842,5 µg/g; Ostim® plus 20) zwei Wochen postoperativ lagen ebenso wie die medianen Knochenmarkskonzentrationen deutlich über diesen Grenzwerten.

Bei elf von 13 Tieren bzw. 23 von 26 Werten waren innerhalb der ersten beiden postoperativen Wochen bakterizide Wirkstoffkonzentrationen für folgende Erreger auf:

- Methicillinsensible *Staphylococcus aureus*
- Verschiedene Streptokokken (*S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, Serogruppe B)
- *Clostridium perfringens*
- *Bacteroides species*
- Fusobakterien
- Propionibakterien
- *Peptostreptococcus species*

Der Clindamycingehalt im Knochenmark lag bei einem von sechs Tieren am zweiten postoperativen Tag unter der Nachweisgrenze. Bei einem von fünf Tieren der zweiten postoperativen Woche unterschritt die Konzentration im Knochenmark die systemtherapeutische Resistenzgrenze. Beim gleichen Tier war keine kortikale Antibiotikumkonzentration messbar.

Ursachen für diese heterogenen lokalen Wirkstoffspiegel können eine stark variierende Pharmakokinetik sowie methodische Ungenauigkeiten sein. Ersteres ist von den Materialeigenschaften der Trägersubstanz (Oberflächenbeschaffenheit, Abbaugeschwindigkeit, Porosität u. a.), den physiko-chemischen Gegebenheiten des Wirkstoffes sowie den Bedingungen im Implantationsbett (Diffusionshindernisse, Durchblutung, Temperatur, pH-Wert etc.) abhängig (Wahlig und Dingeldein, 1987).

Unterschiede zwischen den Versuchstieren, welche diese Varianz erklären würden, oder methodische Fehler sind nicht ersichtlich. Ebenso fanden sich keine Hinweise für eine stark variierende Pharmakokinetik von Ostim<sup>®</sup> plus in vitro, sodass dieses Messverhalten letztlich ungeklärt bleibt.



Auf Grund der großen Variabilitäten und zugleich geringer Stichprobenumfänge ist die Aussagekraft der lokalen Wirkstoffkonzentrationen eingeschränkt. Eine diesbezügliche statistische Auswertung im Hinblick auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit Ostim® plus 10 und 20 ist aus diesem Grund nicht möglich und muss ggf. durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Für die klinische Anwendung stellt sich die Frage, inwieweit die hier überwiegend beobachtete Therapiedauer von zwei Wochen für die Behandlung von Knocheninfektionen ausreichend ist.

Empfehlungen für eine systemische antimikrobielle Therapie beinhalten überwiegend Behandlungszeiten von vier bis sechs Wochen (Mader et al., 1996; Waldvogel et al., 1970a, b, c, d). Parenterale Dosisregime variieren zwischen einer achtstündlichen Gabe von 900 mg (Mader et al., 1999) sowie für gramnegative Anaerobier bzw. *Staphylococcus aureus* zwischen 600 mg bzw. 300 mg sechstündlich (Xue et al., 1996). Da die Therapieempfehlung von MADER et al. (1999) sich nicht auf bestimmte Erreger beschränkt, soll diese im Weiteren für einen Vergleich zwischen lokaler und systemischer antimikrobieller Therapie herangezogen werden.

Bei einer Serum-Knochen-Ratio zwischen 0,31 (Budsberg et al., 1991) und 0,4 in gesundem Knochen (Mader et al., 1989; Nicholas, P. et al., 1975) bzw. 0,98 in entzündetem Gewebe (Mader et al., 1989) ist unter einem Dosisregime von dreimal täglich 900 mg i. v. mit maximalen ossären Konzentrationen zwischen 3,2 µg/g und 9,44 µg/g bzw. 10,2 µg/g bis 23,1 µg/g zu rechnen. Die medianen Gewebekonzentrationen unserer Untersuchung übertrafen diese Werte zwei Tage postoperativ ca. um den Faktor 100 bis 1000, zwei Wochen postoperativ um den Faktor 10 bis 100.

Inwieweit diese höheren Gewebekonzentrationen durch eine zunehmende bakterizide Wirkung eine effektive Behandlung in nur zwei Wochen ermöglichen und ob eine begleitende systemische antimikrobielle Therapie weiterhin erforderlich ist, kann aus den verfügbaren pharmakokinetischen Daten letztlich nicht geschlossen werden.

### V.5.3. Antibiotikaträgersysteme im pharmakokinetischen Vergleich

Ein Vergleich verschiedener Antibiotikaträgersysteme ist auf Grund stark variierender Versuchsanordnungen, wie Operations-, Tiermodell, Implantatmenge, Nachbeobachtungszeiten u. a. nur bedingt möglich. Erschwerend limitiert sich die Anzahl von Messzeitpunkten, da dies in der Regel eine Euthanasie der Versuchstiere erfordert. Dies spiegelt sich in den teilweise großen Standardabweichungen der Mittelwerte wieder. Die folgende Darstellung kann deshalb nur orientierend einen Überblick geben.

*Tabelle 9: Mittlere ossäre Wirkstoffkonzentrationen nach Implantation verschiedener Antibiotikaträgersysteme mit Standardabweichung.*

System	Antibiotikummenge/ Implantat	Ø AB- Konzentration Ossäre Maxima (µg/g)	Zeitpunkt der AB-Maxima	Dauer wirk- samer AB- Spiegel <sup>1</sup>	Maxima Serum- konzent- ration(µg/ml)	Tiermodell	Autor(en)
Eigene Untersuchung:							
Ostim® 35+ Clindamycin 10/20	Clindamycin-HCl (≈ 100 mg/200 mg)	964,5 (± 603,9)/ 4107,2 (± 5600,5)	2. d	≥2 w	1,29 / 1,6 (± 0,7/ ± 0,91)	Kaninchen	Eigene Untersuchung
Poly-, Oligo- und Dimere:							
Septopal® (PMMA)-Kugeln	Gentamycinbase (≈ 63–166 mg)	20 (Einzelwert)	7. d	4 w	0,3 (Einzel- wert)	Hund	Wahlig, et al. (1978)
Palacos® R (PMMA)-Zement	Gentamycin	5,8	7. d	≥2 a	-	Hund	Wahlig et al. (1980)
Acryl-Knochen- zement	5 mg Gentamycin	23,6 (± 0,7)	5. d	13 w	-	Ratte	Korkusuz et al. (1993)
Acryl-Knochen- zement	Oxacillin	127	1. d	≥3 w	-	Hund	Marks et al. (1976)
50:50 Poly- Milchs.-Co- Glykolsäur.	Ciprofloxacin-HCl (100 mg)	1800 (± 1200)	42. d (6 w)	≥6 w <b>A</b>	1,3	Kaninchen	Ramchandani und Robinson (1998)
85:15 D,L- Laktat:Glykol- Polymer	Ofloxacin (10 mg)	-	-	≥4 w	0,38	Kaninchen	Nie et al. (1998)
Polyglykolsäure	Ciprofloxacin	240	2. d	≥6 w	-	Kaninchen	Overbeck et al. (1995)
Milchsäure- oligomer	Dideoxykana- mycin B	1000	7. d	6 w <b>B</b>	1,29 (± 0,22)	Kaninchen	Wei et al. (1991)
DL-Di-Milchsäure	Perfloxacin	75,6 (± 1,6)	15. d	30 d <b>C</b> (4,2 w)	0	Kaninchen	Kanellakopoulou + Giamarellos- Blurboulis (2000)
Fettsäure-Dimer+ Sebacins.	Gentamycinsulfat (10%/20%) (≈ 58/116 mg)	1,7/4,0	7. d	≥8 w	0,59/1,03	Kaninchen	Nelson et al. (1997)

<sup>1</sup> Lokale Konzentration über der systemtherapeutischen Resistenzgrenze

A bei Resistenzgrenze = 1-2 µg/ml

B bei Resistenzgrenze ≤ 1.56 µg/g

C bei Resistenzgrenze ≤ 0.5 µg/ml

System	Antibiotikummenge/ Implantat	Ø AB- Konzentration Ossäre Maxima (µg/g)	Zeitpunkt der AB-Maxima	Dauer wirk- samer AB- Spiegel	Maxima Serum- konzent- ration(µg/ml)	Tiermodell	Autor(en)	
Kollagen (Bovines Kollagen Typ I):								
Sulmycin®-Implant (Kollagen- schwamm)	Gentamycinsalz (≈ 8.8 mg) + Gentamycinsulfat (≈ 2.9 mg)	3–10	3. d	≥12 d	0,68 <b>A</b>	Kaninchen	Wahlig und Dingeldein (1988)	
Kollagen- schwamm	Gentamycin	13.2	7. d	8 w	-	Kaninchen	Sternberger et al. (1997)	
Kollagen- schwamm	Gentamycinsulfat (130 mg)	1025,2 (± 1162,6)	12 h	≥4 w	1,25 (± 0,29)	Kaninchen	Humphrey et al. (1998)	
Calciumphosphatverbindungen:								
Poröse HA- Keramik <sup>1</sup>	5 mg Gentamycinsulfat	60 (± 12)	8. d	≈3 M	-	Ratte	Korkusuz et al. (1993)	
TCP-Keramik- granulat <sup>2</sup>	Flucloxacillin-Na (15 Gew%)	0,9	1. d	1 d	-	Hund	Eitenmüller et al. (1983)	
	<b>B</b>	629,1	1. d					
	Fosfomycin (12 Gew%)	2,46	3. d	3 d	-	Hund		
TCP-Keramik; Porosität: 45%	2.74–4.49 mg Gentamycin	≤1,5	≤2 d	0 d	-	Kaninchen	Lambotte et al. (1998)	
Ca-P <b>3</b> -Zement + PLA <b>4</b>	Gentamycinsulfat	Knochenmark: 134,2	24. d	54 d (7,7 w)	-	Kaninchen	Sasaki und Ishii (1999)	
Glasskeramik :								
Apatit-Wollastonit- Glasskeramik	Isepamicinsulfat			≥8 w	-	Kaninchen	Kawanabe et al. (1998)	
Calciumsulfat:								
Calciumsulfat- hemihydrat	Vanco- mycin (60 mg/g)	plain	≈20	4. d	>4 d	0,6-	Kaninchen	Benoit et al. (1997)
		+PLA- GA <b>5</b> - Überzug	≈10	4. d	>3 w	0		
Calciumsulfat- hemihydrat	Tobramycin 4%	80 (± 20)	4. h	≈ 9 d	8,7 (± 2,3)	Kaninchen	Dobrasz, J. et al. (1999)	
Calciumsulfat	Gentamycin	1,9 (± 2,3)	<7. d		2,0 (± 0,5)	Kaninchen	Strauß (1999)	
	Vancomycin	132,5 (± 104,2)	>14. d		1,1 (± 0,3)	Kaninchen		
Fibrin:								
Fibrin	Ciprofloxacin	32.5 (± 2,1)	2. d	10 d	2,9 (± 0,3 )	Kaninchen	Tsourvakas et al. (1995)	
Chitosan :								
Chitosan	Gentamycin (2,7–3,3 mg/kg KG)	40,4	1. d	56 d (8 w)	0,92	Kaninchen	Aimin et al. (1999)	

A nach Implantation von ca. 2 x 4 mg Gentamycinsulfat

1 4 x 3 x 3 mm

2 Tricalciumphosphat; (Korngröße: 2 – 3 mm Durchmesser)

B plus Copolymerüberzug

3 Calciumtriphosphat (75%), Calciumtetraphosphat (20%), Calciumdiphosphat (5%)

4 Poly-L-Milchsäure; (10 000 D)

5 Polymilchsäureglykolsäure

Die durchschnittlichen kortikalen Wirkstoffkonzentrationen erreichten in der vorliegenden Untersuchung am zweiten postoperativen Tag mit 964,5 µg/g (SD: 603,9 µg/g; Ostim® plus 10) und 4107,2 (SD: 5600,5; Ostim® plus 20) ihr Maximum. Ostim® plus 20 übertraf damit die Werte sämtlicher hier aufgeführter Antibiotikaträgersysteme. Ostim® plus 10 erzielte den vierthöchsten Spiegel.

Hohe Werte sind auch bei Poly-Milchsäure-Co-Glykolsäure in Kombination mit Ciprofloxacin in einem vergleichbaren Untersuchungsmodell zu beobachten (Ramchandani und Robinson, 1998). Nach femuraler Implantation von ca. 100 mg des Antibiotikums beim Kaninchen wurden dabei durchschnittliche implantatangrenzende ossäre Wirkstoffkonzentrationen von 1800 µg/g (SD: 1200 µg/g) sechs Wochen postoperativ gemessen.

Mit 1025 µg/ml (SD: 1163 µg/ml) zwölf Stunden postoperativ erreichte ein gentamicinsulfatbesetzter Kollagenschwamm nach femuraler Implantation beim Kaninchen (3 mg Gentamycin/kg KG) vergleichbar hohe Werte (Humphrey et al., 1998).

Das Erreichen der durchschnittlichen Gewebemaximalkonzentration fand bei Ostim® plus am zweiten postoperativen Tag vergleichsweise früh statt, was in Einklang mit der beobachteten In-vitro-Freisetzungskinetik mit initialem *burst* und nachfolgend langsam abfallenden Abgaberaten steht. Da ein früher Wirkungsbeginn ein entscheidender prognostischer Faktor für die Therapie und Prophylaxe von bakteriellen (Knochen-)Infektionen darstellt, ist dieses Wirkprofil als positiv zu bewerten (Jacob et al., 1991).

Ähnlich frühe Wirkstoffspitzen erzielten Gips plus Tobramycin (4. h) (Dobrasz et al., 1999), Acrylknochenzement mit Oxacillin (Marks et al., 1976), Chitosan plus Gentamycin (Aimin et al., 1999) (1. d), Polyglykolsäure plus Ciprofloxacin (Overbeck et al., 1995) und Fibrin mit Ciprofloxacin (Tsourvakas et al., 1995) (2. d), verschiedene Kollagenschwämme (0,5. -7. d) (Humphrey et al., 1998; Wahlig und Dingeldein, 1988) sowie Tricalciumphosphatkeramikpräparate (Eitenmüller et al., 1983; Lambotte et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit lagen die lokalen Clindamycinkonzentrationen bei elf von 13 Tieren für einen Zeitraum von 14 Tagen über der systemtherapeutischen Resistenzgrenze (4 µg/g).

Wirksame ossärer Antibiotikumkonzentrationen (>MHK) bestehen bei unbeschichteten Tricalciumphosphatkeramiken für die Dauer von Null bis drei Tagen (Eitenmüller et al., 1983; Lambotte et al., 1998), bei Calciumsulfat mit Tobramycin ca. neun Tage (Dobrasz et al., 1999) und mit Vancomycin über vier Tage (Benoit *et al.*, 1997). Fibrin plus Ciprofloxacin erzielte eine Therapiedauer von zehn Tagen (Tsourvakas et al., 1995) und Sulmycin<sup>®</sup>-Implant plus Gentamycinsalz sowie ein handelsüblicher gentamycinbeladener Kollagenschwamm zwölf Tage (Wahlig und Dingeldein, 1988).

Übertroffen wurde eine zweiwöchige Wirkdauer im Tierversuch unter anderem von Septopal<sup>®</sup> plus Gentamycinsulfat (4 w) (Wahlig et al., 1978a), gentamycinsulfat-besetztem Kollagenschwamm (Humphrey et al., 1998; Stemberger et al., 1997) (8 bzw. 4 w), einer porösen HA-Keramik mit Gentamycinsulfat (ca. 3 M) (Korkusuz et al., 1993) und Polymilchsäure-Co-Glykolsäure plus Ciprofloxacin (6 w) (Ramchandani und Robinson, 1998).

#### V.5.4. Serumspiegel

Für eine achtstündliche Gabe von 900 mg Clindamycin i. v. ermittelten FLAHERTY et al. (1988) durchschnittliche maximale Serumspiegel von 16,3 µg/ml (SD: 4,0 µg/ml) und mittlere Zwölf-Stunden-Werte von 0,9 µg/ml (SD: 0,5 µg/ml). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen DE HAAN et al. (1972), die nach einmaliger intravenöser Infusion von 900 mg Clindamycin durchschnittliche Serumhöchstwerte von 10,4 µg/ml bei gesunden Probanden und 23,6 µg/ml bei Patienten sowie durchschnittliche Zwölf-Stunden-Werte von 1,1 µg/ml beobachteten.

Nach Implantation von Ostim<sup>®</sup> plus 10/20 lagen die jeweiligen postoperativen Clindamycinhöchstwerte im Serum mit einem geometrischen Mittel von 1,109 µg/ml [0,325; 3,785] bzw. 1,297 µg/ml [0,454; 3,706] ( $p=0,57535$ ) ca. um den Faktor zehn bis 20 unter diesen Werten. Systemische Nebenwirkungen sind demnach bei lokaler Applikation von Ostim<sup>®</sup> plus in geringerem Maße zu erwarten als bei systemischer Wirkstoffapplikation.

Dies steht in Übereinstimmung mit zahlreichen Untersuchungen zur Pharmakokinetik lokal applizierter Antibiotikaträgermaterialien (Blaha et al., 1993; Gitelis und Brebach, 2002; Kanellakopoulou und Giamarellos-Bourboulis, 2000; Letsch et al., 1993; Liu et al., 2002; Mader et al., 2002; Stemberger et al., 1997; Walenkamp et al., 1998; Zilch und Lambiris, 1986).

Die postoperativen Clindamycinserumkonzentrationen von Ostim<sup>®</sup> plus 10/20 wiesen im zeitpunktweisen Testen keine Hinweise auf Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf. Ursächlich hierfür können große Variabilitäten, die kleinen Stichprobenumfänge sowie der anteilig sehr geringe Übertritt des Wirkstoffs in den systemischen Kreislauf sein.

Inwieweit durch einen höheren Clindamycinanteil in der Prüfsubstanz länger anhaltende und höhere lokale Wirkstoffspiegel bei weiterhin niedrigen Serumspiegeln zu erzielen sind, müssen weiterführende Untersuchungen, ggf. mit einer größeren Versuchstierzahl zeigen.

### **V.5.5. In-vitro-Freisetzungskinetik von Ostim® plus**

Die Eluierung erfolgte in Phosphatpuffer mit pH 7,4 und einer Temperatur von 37 °C um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen.

Im dreitägigen Elutionsversuch zeigte Ostim® plus 25 eine exponentielle Freisetzungskinetik in Form von initial hohen und anschließend abfallenden Abgaberraten. Die dabei erzielte durchschnittliche Wirkstoffkonzentration übertraf nach einer Stunde mit 1282,08 µg/ml (SD: 127,60 µg/ml) die minimale Hemmkonzentration von 4 µg/ml um ein Vielfaches. Bei Vergleich mit den minimalen Hemm- und -bakteriziden Konzentrationen (s. Tabelle 2, Seite 54) zeigt sich, dass hierdurch eine antibakterielle Wirkung gegen sämtliche osteomyelitisrelevanten Erreger besteht.

In der achten Stunde nach Versuchsbeginn erzielten die Proben erstmals eine durchschnittliche Clindamycinabgabekonzentration, die unter der minimalen Hemmkonzentration lag (3,29 µg/ml/h, SD: 1,22 µg/ml/h). Zu diesem Zeitpunkt waren lediglich 7,65% der initial vorhandenen Antibiotikummenge freigesetzt worden. Dennoch fand bis zum Versuchsende (72 h) keine signifikante Abgabe mehr statt.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene In-vivo-Pharmakokinetik wies im Gegensatz hierzu eine prolongiertere und vollständigere Wirkstofffreisetzung, über zwei bis vier Wochen auf. Hierbei ist zu bedenken, dass durch stündliche Wechsel der Eluatlösung eine Anreicherung der Prüfsubstanz oder Speicherung in umgebendem Gewebe, wie sie in vivo zu erwarten ist, nicht stattfindet.

Die Proben erwiesen sich im Eluationsversuch als weitestgehend lösungsstabil, sodass eine Substratfreisetzung allein aus den peripheren Anteilen diskutiert werden kann. Eine entscheidende Mitbeeinflussung der Pharmakokinetik von Ostim® plus durch biologische, biochemische und biomechanische Erschließungs- und Degradationsvorgängen ist somit anzunehmen.

## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Eignung von phasenreinem, nanokristallinem Hydroxylapatit (Ostim®) als Knochenersatzmaterial und Antibiotikumträgersystem in Kombination mit Clindamycin.

Nach femuraler Implantation bei 26 Kaninchen und einer polychromen Sequenzmarkierung mit Calceingrün und Alizarinkomplexon erfolgte eine histologische und fluoreszenzoptische Befundung mit Nachbeobachtungszeiten von zwei und vier Wochen.

Pharmakokinetische Fragestellungen hatten die Messung der Freisetzungskinetik in vitro und in vivo sowie der postoperativ auftretenden Serumspiegel zum Inhalt.

Die Ostim®-Paste füllte den Defekt formschlüssig aus und unterlag einer vom Lagerknochen ausgehenden, zellulär-vaskulären Erschließung durch Makrophagen, Granulozyten, mehrkernige Riesenzellen vom ungeordneten Typ und Blutgefäße. Das Interface stellte sich weitestgehend bindegewebsfrei dar. Neu gebildete Geflechtknochen trabekel wuchsen unter osteokonduktiver Wirkung von Ostim®-Schollen vom Lagerknochen aus in das Defektzentrum vor.

In komplett knöchern durchbauten Defektbereichen zeigte die Prüfsubstanz einen vollständigen Abbau, in den übrigen Bereichen lag sie grobschollig zerfallen bis kompakt vor und war von Zellstraßen durchzogen.

Bei zehn von 13 Tieren erzielte Ostim® plus lokal bakteriostatische und teilweise bakterizide Wirkstoffkonzentrationen gegen die meisten kausalen Erreger von Knocheninfektionen für die Dauer von zwei Wochen. Die durchschnittlichen Serumhöchstwerte lagen dabei um den Faktor zehn bis 20 unter denen einer systemischen Therapie.



Ostim<sup>®</sup> erwies sich als osteokonduktives Knochenersatzmaterial mit einfacher Applikation, formschlüssiger Defektfüllung, guter Biokompatibilität und einem vollständigen, an die Knochenneubildungsrate angepassten, Abbau.

Unter Clindamycinzusatz war eine signifikante Verzögerung der zellulären und vaskulären Implantaterschließung, des Implantatabbaus und der knöchernen Heilungsprozesse zu beobachten. Inwieweit dies auf eine, durch gastrointestinale Nebenwirkungen bedingte, Reduktion des Allgemeinzustandes dieser Tiere, eine direkte Clindamycinwirkung oder durch Wechselwirkungen zwischen Clindamycin und Ostim<sup>®</sup> zurückzuführen ist, kann die vorliegende Untersuchung nicht beantworten und müssen ggf. weitere Studien klären.

## **VII. SUMMARY**

The present study investigated the properties of nanocrystalline hydroxyapatite (Ostim<sup>®</sup>) as bone substitute and implantable drug delivery system (IDDS) in combination with clindamycin.

After femoral implantation in 26 White New Zealand rabbits and fluorochrom-imaging with calceingreen and alizarin complexon, histological and fluorescenceoptic evaluation were made after a follow-up of two and four weeks.

Pharmacokinetic studies characterised the drug release in vitro and in vivo, including postoperative serum drug levels.

The defect was filled out completely by the Ostim<sup>®</sup>-paste. Macrophages, segmented granulocytes, multinucleated giant cells and blood vessels migrated into it from the periphery. The interface was mostly free of connective tissue. New formation of woven bone trabeculae proceeded from the mature bone into the defect under osteoconduction of bigger Ostim<sup>®</sup>-particles.

In areas filled with new bone the implant was completely degraded, in others it was decomposed into clods or it was a massive paste with invaded cell streets.

In ten of 13 animals Ostim<sup>®</sup> plus achieved local bacteriostatic and partly bactericide concentrations against most causative bacteria of osteomyelitis for a period of two weeks. Serum peak levels were on average ten to 20 times lower than with systemic application.

Ostim<sup>®</sup> proved to be a osteoconductive bone substitute with easy handling, form-fit filling of the created bone defect, good biocompatibility and a complete degradation, adapted to the rate of new bone formation.

In combination with clindamycin significant decrease of cellular and vascular invasion, implant degradation and new bone formation was observed. Whether this is caused by an observed decreased general condition of the animals due to gastrointestinal side effects, a direct effect of clindamycin or an interaction between clindamycin and Ostim<sup>®</sup> is not clear and may further studies show.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaboe, M., Schou, S., Hjorting-Hansen, E., Helbo, M. und Vikjaer, D.: Osseointegration of subperiosteal implants using bovine bone substitute and various membranes. *Clin Oral Implants Res*, **11**: 51-8. (2000).
- Adams, K., Couch, L. und Cierny, G.: In vitro and in vivo evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated polymethylmethacrylate beads. *Clin Orthop*, **284**: (Nov 1992).
- Aho, A.J., Eskola, J., Ekfors, T., Manner, I., Kouri, T. und Hollmen, T.: Immune responses and clinical outcome of massive human osteoarticular allografts. *Clin Orthop*, 196-206. (1998).
- Aimin, C., Chunlin, H., Juliang, B., Tinyin, Z. und Zhichao, D.: Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis. *Clin Orthop*, 239-47. (1999).
- Al Ruhaimi, K.A.: Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **16**: 105-14. (2001).
- Alam, S.I., Khan, K.A. und Ahmad, A.: Glycocalyx positive bacteria isolated from chronic osteomyelitis and septic arthritis. *Ceylon Med J*, **35**: 21-3. (1990).
- Albrektsson, T.: Repair of bone grafts. A vital microscopic and histological investigation in the rabbit. *Scand J Plast Reconstr Surg*, **14**: 1-12 (1980).
- Anders, S., Schaumburger, J. und Grifka, J.: Intraartikuläre operative Maßnahmen bei Arthrose. *Orthopäde*, **30**: 866-880 (2001).
- Anderson, J.M., Niven, H., Pelagalli, J., Olanoff, L.S. und Jones, R.D.: The role of the fibrous capsule in the function of implanted drug- polymer sustained release systems. *J Biomed Mater Res*, **15**: 889-902. (1981).
- Anderson, R., Joone, G. und van Rensburg, C.E.: An in vitro investigation of the intracellular bioactivity of amoxicillin, clindamycin, and erythromycin for *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, **153**: 593-600. (1986).
- Angeskirchner, J., Brucker, P., Burkart, A. und Imhoff, A.: Large osteochondral defects of the femoral condyle: press-fit transplantation of the posterior femoral condyle (MEGA-OATS). *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc; online-Publikation*, DOI 10.1007: (2001).
- Anwar, H., Dasgupta, M.K. und Costerton, J.W.: Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **34**: 2043-6. (1990).
- Anwar, H., Strap, J.L. und Costerton, J.W.: Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, **36**: 1347-51. (1992).
- Arnaud, E.: Advances in cranioplasty with osteoinductive biomaterials: summary of experimental studies and clinical prospects. *Childs Nerv Syst*, **16**: 659-68. (2000).

- Asahina, I., Sampath, T.K., Nishimura, I. und Hauschka, P.V.: Human osteogenic protein-1 induces both chondroblastic and osteoblastic differentiation of osteoprogenitor cells derived from newborn rat calvaria. *J Cell Biol*, **123**: 921-33. (1993).
- Astry, C.L., Nelson, S., Karam, G.H. und Summer, W.R.: Interactions of clindamycin with antibacterial defenses of the lung. *Am Rev Respir Dis*, **135**: 1015-9. (1987).
- Atkins, B. und Gottlieb, T.: Fusidic acid in bone and joint infections. *Int J Antimicrob Agents*, **12 Suppl 2**: S79-93. (1999).
- Axhausen, G.: Histologische Untersuchungen über Knochentransplantationen am Menschen. *Dtsch Z Chir*, **91**: (1908 a).
- Axhausen, G.: Die pathologisch-anatomischen Grundlagen der Lehre von der freien Knochentransplantation beim Menschen und Tier. *Med. klin. Beihefte*, **23**: (1908 b).
- Axhausen, W.: [On the biology of bone transplantation]. *Zentralbl Chir*, **92**: 1152-60. (1967).
- Baltzer, A., Bekcer, C., Liebau, C., Krauspe, R. und Merk, H.: Knorpel-Knochen-Transplantation am oberen Sprunggelenk. *Arthroskopie*, **13**: 109-112 (2000).
- Basle, M.F., Chappard, D., Grizon, F., Filmon, R., Delecryn, J., Daculsi, G. und Rebel, A.: Osteoclastic resorption of Ca-P biomaterials implanted in rabbit bone. *Calcif Tissue Int*, **53**: 348-56. (1993).
- Bassett, C.A.L. und Herrmann, I.: Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature*, **190**: 460-1 (1961).
- Bauer, T.W. und Muschler, G.F.: Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop*, 10-27. (2000).
- Baxter, R., Chapman, J. und Drew, W.L.: Comparison of bactericidal activity of five antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, **161**: 1023-5. (1990).
- Beachey, E.H., Chiang, T.M. und Kang, A.H.: Collagen-platelet interaction. *Int Rev Connect Tissue Res*, **8**: 1-21 (1979).
- Becker, G.: Kälteexponierte Arzneimittel - Verwenden oder verwerfen? *Pharm. Ztg.*, **38**: 2302-2306 (1986).
- Becker, P.L., Smith, R.A., Williams, R.S. und Dutkowsky, J.P.: Comparison of antibiotic release from polymethylmethacrylate beads and sponge collagen. *J Orthop Res*, **12**: 737-41. (1994).
- Begley, C.T., Doherty, M.J., Mollan, R.A. und Wilson, D.J.: Comparative study of the osteoinductive properties of bioceramic, coral and processed bone graft substitutes. *Biomaterials*, **16**: 1181-5. (1995).
- Behrens, P., Wolf, E. und Bruns, J.: [In vitro culture of human autologous osteoblast cells on natural bone mineral]. *Orthopäde*, **29**: 129-34. (2000).
- Benoit, M.A., Mousset, B., Delloye, C., Bouillet, R. und Gillard, J.: Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co- glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections. *Int Orthop*, **21**: 403-8 (1997).

- Berglundh, T. und Lindhe, J.: Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*, **8**: 117-24. (1997).
- Bezrukov, V.M., Grigoryants, L.A., Zuev, V.P. und Pankratov, A.S.: [The surgical treatment of jaw cysts using hydroxyapatite with an ultrahigh degree of dispersity]. *Stomatologija*, **77**: 31-5 (1998).
- Blaha, J.D., Calhoun, J.H., Nelson, C.L., Henry, S.L., Seligson, D., Esterhai, J.L., Jr., Heppenstall, R.B., Mader, J., Evans, R.P., Wilkins, J. und et al.: Comparison of the clinical efficacy and tolerance of gentamicin PMMA beads on surgical wire versus combined and systemic therapy for osteomyelitis. *Clin Orthop*, 8-12. (1993).
- Bonk, U. und Frieden, H.: [Tissue compatibility of gentamycin PMMA beads and chains (author's transl)]. *Arch Orthop Trauma Surg*, **93**: 241-2. (1979).
- Bonucci, E.: New knowledge on the origin, function and fate of osteoclasts. *Clin Orthop*, **158**: 252-69 (1981).
- Borges, J.S., Schleider, M. und Roberts, R.B.: In vivo development of resistance to clindamycin by *Staphylococcus aureus*. *Postgrad Med*, **58**: 153-4. (1975).
- Boselli, E. und Allaouchiche, B.: [Diffusion in bone tissue of antibiotics]. *Presse Med*, **28**: 2265-76. (1999).
- Bosse, A., Wuisman, P., Jones, D.B. und Schwarz, K.: Noncollagenous proteins in heterotopic ossification. Immunohistochemical analysis in 15 paraplegies. *Acta Orthop Scand*, **64**: 634-8. (1993).
- Bowyer, G.W. und Cumberland, N.: Antibiotic release from impregnated pellets and beads. *J Trauma*, **36**: 331-5. (1994).
- Braun, C.: Autogenously vascularised bone allografts. Experimental model of a new bone-muscle composite graft. *Arch Orthop Trauma Surg*, **111**: 250-4 (1992).
- Bucholz, H.W. und Engelbrecht, H.: [Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins]. *Chirurg*, **41**: 511-5. (1970).
- Bucholz, R.W.: Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop*, 44-52. (2002).
- Bucholz, R.W., Carlton, A. und Holmes, R.E.: Hydroxyapatite and tricalcium phosphate bone graft substitutes. *Orthop Clin North Am*, **18**: 323-34 (1987).
- Bucholz, R.W., Carlton, A. und Homes, R.: Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop Rel Res*, **240**: 53-63 (1988).
- Budsberg, S.C., Gallo, J.M., Starliper, C.E., Shotts, E.B. und Brown, J.: Comparison of cortical bone and serum concentrations of clindamycin achievable by direct local infusion and intravenous administration. *J Orthop Res*, **9**: 594-9. (1991).
- Burchardt, H.: The biology of bone graft repair. *Clin Orthop*, 28-42. (1983).
- Burgaleta, C., Velasco, G.L., Peletier, R., Messeguer, M. und Pernas, M.: [The effect of clindamycin on intraphagocytic *Staphylococcus aureus* in leukocytes from patients with chronic osteomyelitis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **10**: 143-7. (1992).

- Butts, T.E., Peterson, L.J. und Allen, C.M.: Early soft tissue ingrowth into porous block hydroxyapatite. *J Oral Maxillofac Surg*, **47**: 475-9 (1989).
- Calhoun, J.H., Klemm, K., Anger, D.M. und Mader, J.T.: Use of antibiotic-PMMA beads in the ischemic foot. *Orthopedics*, **17**: 453-7; discussion 458. (1994).
- Campbell, D.G. und Li, P.: Sterilization of HIV with irradiation: relevance to infected bone allografts. *Aust N Z J Surg*, **69**: 517-21. (1999).
- Campbell, D.G., Li, P., Stephenson, A.J. und Oakeshott, R.D.: Sterilization of HIV by gamma irradiation. A bone allograft model. *Int Orthop*, **18**: 172-6. (1994).
- Campbell, D.G. und Oakeshott, R.D.: Bone allograft banking in South Australia. *Aust N Z J Surg*, **65**: 865-9. (1995).
- Cancian, D.C., Hochuli-Vieira, E., Marcantonio, R.A. und Marcantonio, E., Jr.: Use of BioGran and Calcite in bone defects: histologic study in monkeys (*Cebus apella*). *Int J Oral Maxillofac Implants*, **14**: 859-64. (1999).
- Carmagnola, D., Abati, S., Celestino, S., Chiapasco, M., Bosshardt, D. und Lang, N.P.: Oral implants placed in bone defects treated with Bio-Oss, Ostim-Paste or PerioGlas: an experimental study in the rabbit tibiae. *Clin Oral Implants Res*, **19**: 1246-53 (2008).
- Caulier, H., van der Waerden, J.P., Paquay, Y.C., Wolke, J.G., Kalk, W., Naert, I. und Jansen, J.A.: Effect of calcium phosphate (Ca-P) coatings on trabecular bone response: a histological study. *J Biomed Mater Res*, **29**: 1061-9. (1995).
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D. und Buret, A.: The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, **37**: 1771-6. (1999).
- Chambers, I.J.: The response of the macrophage to foreign material. In: Fundamental Aspects of Biocompatibility. Vol I, Williams, D. G. *CRC Press Boca Raton Florida*, 145-158 (1981).
- Champagne, C.M., Takebe, J., Offenbacher, S. und Cooper, L.F.: Macrophage cell lines produce osteoinductive signals that include bone morphogenetic protein-2. *Bone*, **30**: 26-31. (2002).
- Chang, B.S., Lee, C.K., Hong, K.S., Youn, H.J., Ryu, H.S., Chung, S.S. und Park, K.W.: Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations. *Biomaterials*, **21**: 1291-8. (2000).
- Chang, C.-S., Matukas, V.J. und Lemons, J.E.: Histologic study of hydroxylapatite as an implant material for mandibular augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*, **41**: 729-37 (1983).
- Chang, C.Y. und Yamada, S.: Evaluation of the regenerative effect of a 25% doxycycline-loaded biodegradable membrane for guided tissue regeneration. *J Periodontol*, **71**: 1086-93. (2000).
- Chang, F.N., Sih, C.J. und Weisblum, B.: Lincomycin, an inhibitor of aminoacyl sRNA binding to ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **55**: 431-8. (1966).
- Chang, R.C. und Kao, A.S.: Biomechanical and histological studies of particulate hydroxylapatite implanted in femur bone defects of adult dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **29**: 54-61. (2000).

- Chappard, D., Fressonnet, C., Genty, C., Basle, M.F. und Rebel, A.: Fat in bone xenografts: importance of the purification procedures on cleanliness, wettability and biocompatibility. *Biomaterials*, **14**: 507-12. (1993).
- Chappard, D., Zhioua, A., Grizon, F., Basle, M.F. und Rebel, A.: [Biomaterials for bone filling: comparisons between autograft, hydroxyapatite and one highly purified bovine xenograft]. *Bull Assoc Anat (Nancy)*, **77**: 59-65. (1993).
- Chen, L., Klaes, W. und Assenmacher, S.: [A comparitiv morphometric and histologic study of five bone substitute materials.]. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih*, **76**: 527-30 (1996).
- Chris Arts, J.J., Verdonschot, N., Schreuers, B.W. und Buma, P.: The use of a bioresorbable nano-crystalline hydroxyapatite paste in acetabular bone impaction grafting. *Biomaterials.*, **27**: 1110-8 (2006).
- Chuard, C., Lucet, J.C., Rohner, P., Herrmann, M., Auckenthaler, R., Waldvogel, F.A. und Lew, D.P.: Resistance of Staphylococcus aureus recovered from infected foreign body in vivo to killing by antimicrobials. *J Infect Dis*, **163**: 1369-73. (1991).
- Ciampolini, J. und Harding, K.G.: Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often? *Postgrad Med J*, **76**: 479-83. (2000).
- Clokie, C.M., Moghadam, H., Jackson, M.T. und Sandor, G.K.: Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg*, **13**: 111-21; discussion 122-3. (2002).
- Constantz, B.R., Barr, B.M., Ison, I.C., Fulmer, M.T., Baker, J., McKinney, L., Goodman, S.B., Gunasekaren, S., Delaney, D.C., Ross, J. und Poser, R.D.: Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res*, **43**: 451-61. (1998).
- Constantz, B.R., Ison, I.C., Fulmer, M.T., Poser, R.D., Smith, S.T., VanWagoner, M., Ross, J., Goldstein, S. A., Jupiter, J.B. und Rosenthal, D.I.: Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science*, **267**: 1796-9. (1995).
- Contzen, H.: Knochentransplantation - Indikation und Technik. *Unfallchirurgie*, **15**: 184-8 (1989).
- Cooper, R., Milgram, J.W. und Robinson, R.A.: Morphology of the osteon. *J Bone Joint Surg*, **48-A**: 1239-1271 (1966).
- Cornell, C.N. und Lane, J.M.: Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop*, S267-73. (1998).
- Costerton, J.W.: Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, **11**: 217-21; discussion 237-9. (1999).
- Craig, W.: Pharmacodynamics of antimicrobial agents as a basis for determining dosage regimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **12**: S6-8. (1993).
- Craig, W.A.: Choosing an antibiotic on the basis of pharmacodynamics. *Ear Nose Throat J*, **77**: 7-11; discussion 11-2. (1998).
- Craig, W.A.: Does the dose matter? *Clin Infect Dis*, **33 Suppl 3**: S233-7. (2001).

- Cullum, P.E., Frost, D.E., Newland, T.B., Keane, T.M. und Ehler, W.J.: Evaluation of Hydroxylapatite Particles in Repair of Alveolar Clefts in Dogs. *J Oral Maxillofac Surg*, **46**: 290-6 (1988).
- Culson, R.A.: Relationship between fluid flow and O<sub>2</sub> demand in tissues in vivo and in vitro. *Perspect Biol Med*, **27**: 121-6 (1983).
- Daculsi, G.: Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials*, **19**: 1473-8. (1998).
- Daculsi, G., Bouler, J.-M. und LeGeros, R.Z.: Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *International Review of Cytology*, **172**: 129-91 (1997).
- Daculsi, G., Hartmann, D.J., Heughebaert, M., Hamel, L. und Le Nihouannen, J.C.: In vivo cell interactions with calcium phosphate bioceramics. *J Submicrosc Cytol Pathol*, **20**: 379-84. (1988).
- Daculsi, G., LeGeros, R.Z., Heughebaert, M. und Barbieux, I.: Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue Int*, **46**: 20-7. (1990).
- Daculsi, G., Passuti, N., Martin, S., Deudon, C., Legeros, R.Z. und Raher, S.: Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dogs. Clinical and histological study. *J Biomed Mater Res*, **24**: 379-96. (1990).
- Daculsi, G., Pilet, P., Cottrel, M. und Guicheux, G.: Role of fibronectin during biological apatite crystal nucleation: ultrastructural characterization. *J Biomed Mater Res*, **47**: 228-33. (1999).
- Daculsi, G., Rohanizadeh, R., Weiss, P. und Bouler, J.M.: Crystal polymer interaction with new injectable bone substitute; SEM and Hr TEM study. *J Biomed Mater Res*, **50**: 1-7. (2000).
- Dalkyz, M., Ozcan, A., Yapar, M., Gokay, N. und Yuncu, M.: Evaluation of the effects of different biomaterials on bone defects. *Implant Dent*, **9**: 226-35 (2000).
- Dall, L., Keilhofner, M., Herndon, B., Barnes, W. und Lane, J.: Clindamycin effect on glycocalyx production in experimental viridans streptococcal endocarditis. *J Infect Dis*, **161**: 1221-4. (1990).
- Dambe, L.T., Saur, K. und Schweiberer, L.: [The revascularisation of fresh homologous bone grafts in the diaphysis of long bones in dogs (author's transl)]. *Arch Orthop Trauma Surg*, **92**: 35-45. (1978).
- Dan, M., Yampolsky, E. und Poch, F.: Serum concentrations and ex vivo inhibitory/bactericidal activity of clindamycin after administration of two oral dosages. *Chemotherapy*, **43**: 227-31. (1997).
- Dash, A.K. und Suryanarayanan, R.: An implantable dosage form for the treatment of bone infections. *Pharm Res*, **9**: 993-1002. (1992).
- DeHaan, R.M., Metzler, C.M., Schellenberg, D., VandenBosch, W.D. und Masson, E.L.: Pharmacokinetic studies of clindamycin hydrochloride in humans. *Int J Clin Pharmacol*, **6**: 105-19. (1972).
- Dhawan, V.K. und Thadepalli, H.: Clindamycin: a review of fifteen years of experience. *Rev Infect Dis*, **4**: 1133-53. (1982).



- Dielert, E., Fischer-Brandies, E. und Bagambisa, F.: REM-Untersuchungen an den Grenzschichtstrukturen. *Dtsch Zahnärztl Z*, **43**: 22-5 (1988).
- DiMaio, F.R., O'Halloran, J.J. und Quale, J.M.: In vitro elution of ciprofloxacin from polymethylmethacrylate cement beads. *J Orthop Res*, **12**: 79-82. (1994).
- DIN 58940: Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. (1989).
- Dingeldein, E.: Vergleichende Beurteilung der Wirksamkeit verschiedener Antibiotika bei der infizierten Totalendoprothese. In: *Knochenzement - Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopädie von C. Burri, F. Harder, R. Bauer*. Ed by Buchhorn, H.-G.W.G., Verlag Hans Huber (1987).
- Dingeldein, E., Donath, K., Wahlig, H. und Bauer, H.J.: Einheilung einer porösen Hydroxylapatit-Keramik biologischer Herkunft im spongiösen Knochenlager von Kaninchen. *Osteo Int*, **2**: 112-6 (1994).
- Diseases, C.o.I.: Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. In: *MMWR*, p 597. (1988).
- Dmitrieva, L.A., Zuev, V.P., Zvonnikova, L.V., Filatova, N.A. und Alekseeva, A.N.: [The treatment of periodontal diseases with the preparation Linco-HAP]. *Stomatologiia (Mosk)*, **74**: 25-8 (1995).
- Dobrasz, J., Green, C.W., Foresman, P.A. und Rodeheaver, G.T.: Localized delivery of tobramycin from a biocompatible, absorbable bone-void filler. *Society for Biomaterials Annual Meeting, April 28-May 2, 1999*, (1999).
- Doherty, M.J., Schlag, G., Schwarz, N., Mollan, R.A., Nolan, P.C. und Wilson, D.J.: Biocompatibility of xenogeneic bone, commercially available coral, a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts. *Biomaterials*, **15**: 601-8. (1994).
- Doi, K., Tominaga, S. und Shibata, T.: Bone grafts with microvascular anastomoses of vascular pedicles: an experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, **59**: 809-15. (1977).
- Doillon, C.J.: Porous collagen sponge wound dressings: in vivo and in vitro studies. *J Biomater Appl*, **2**: 562-78. (1988).
- Donath, K.: Die Trenn-Dünnschliff-Technik. *Exakt-Kulzer-Druckschrift, Norderstedt*, (1989).
- Doran, J.E. und Rissing, J.P.: Influence of clindamycin on fibronectin-staphylococcal interactions. *J Antimicrob Chemother*, **12 Suppl C**: 75-83. (1983).
- Draenert, K. und Draenert, Y.: Ein neues Verfahren für die Knochenbiopsie und die Knorpel-Knochen-Transplantation. *Sandorama*, **2**: 31-8 (1987).
- Dreesmann, H.: Über Knochenplombierung. *Beitr klin Chir*, **9**: 804-10 (1892).
- Dreher, E.: Bestimmung der Spezifischen Oberfläche von Ostim nach BET. *Interner Bericht, Acordis Industrial Fibers*, (2001).
- Du, C., Cui, F.Z., Feng, Q.L., Zhu, X.D. und de Groot, K.: Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity. *J Biomed Mater Res*, **42**: 540-8. (1998).

- Du, C., Cui, F.Z., Zhu, X.D. und De Groot, K.: Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res*, **44**: 407-15 (1999).
- Duan, Y., Lu, W., Wang, C., Chen, J. und Zhang, X.: [The effects of surface morphology of calcium phosphate ceramics on apatite formation in dynamic SBF]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, **19**: 186-90. (2002).
- Ducheyne, P., Bianco, P.D. und Kim, C.: Bone tissue growth enhancement by calcium phosphate coatings on porous titanium alloys: the effect of shielding metal dissolution product. *Biomaterials*, **13**: 617-24 (1992).
- Ducheyne, P. und Cuckler, J.M.: Bioactive ceramic prosthetic coatings. *Clin Orthop*, 102-14. (1992).
- Easmon, C.S. und Crane, J.P.: Cellular uptake of clindamycin and lincomycin. *Br J Exp Pathol*, **65**: 725-30. (1984).
- Eitenmüller, J., Peters, G., Golsong, W., Weltin, R., Gellissen, G. und Reichmann, W.: Die Freisetzungsverzögerung verschiedener Antibiotika aus resorbierbarem Tricalciumphosphat-Keramikgranulat durch die Verwendung löslicher Überzüge zur lokalen Behandlung der Osteomyelitis. *Langenbecks Arch Chir*, **360**: 193-206 (1983).
- Elkins, A.D. und Jones, L.P.: The effects of plaster of Paris and autogenous cancellous bone on the healing of cortical defects in the femurs of dogs. *Vet Surg*, **17**: 71-6. (1988).
- Englert, C., Angele, P., Fierlbeck, J., Dendorfer, S., Schubert, T., Müller, R., Lienhad, S., Zellner, J., Nerlich, M. und Neumann, C.: [Conductive bone substitute material with variable antibiotic delivery]. *Unfallchirurg*, **110**: 408-13 (2007).
- Enneking, W.F. und Mindell, E.R.: Observations on massive retrieved human allografts. *J Bone Joint Surg Am*, **73**: 1123-42. (1991).
- Etherington, D.J., Silver, I.A. und Restall, D.J.: Resorption of insoluble, heterologous, fluorescein-collagen sponges in sensitized and non-sensitized rats. *Br J Exp Pathol*, **60**: 549-59. (1979).
- Faden, H., Hong, J.J. und Ogra, P.L.: In-vivo effects of clindamycin on neutrophil function--a preliminary report. *J Antimicrob Chemother*, **12 Suppl C**: 29-34. (1983).
- Farley, J.R. und Baylink, D.J.: Purification of a skeletal growth factor from human bone. *Biochemistry*, **21**: 3502-7 (1982).
- Feifel, H.: [Bone regeneration in Pro Osteon 500 alone and in combination with Colloss in the patellar gliding model of the rabbit]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, **4 Suppl 2**: S527-30. (2000).
- Feigin, R.D., Shackelford, P., Keeney, R.E. und Middelkamp, J.N.: Treatment of penicillin-resistant staphylococcal infections with clindamycin. *Am J Med Sci*, **261**: 207-12. (1971).
- Fen, G.: [Gentamycin PMMA balls and chains in the treatment of osteomyelitis and soft tissue infections]. *Fortschr Med*, **98**: 1267-70. (1980).

- Flaherty, J.F., Rodondi, L.C., Guglielmo, B.J., Fleishaker, J.C., Townsend, R.J. und Gambertoglio, J.G.: Comparative pharmacokinetics and serum inhibitory activity of clindamycin in different dosing regimens. *Antimicrob Agents Chemother*, 1825-9 (1988).
- Flautre, B., Pasquier, G., Blary, M.C., Anselme, K. und Hardouin, P.: Evaluation of hydroxyapatite powder coated with collagen as an injectable bone substitute: microscopic study in rabbit. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 7: 63-7 (1996).
- Frame, J.W., Rout, P.G.J. und M., B.R.: Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite particles with and without autogenous bone or plaster. *J Oral Maxillofac Surg*, 45: 771-7 (1987).
- Frank, A.L., Marcinak, J.F., Mangat, P.D. und Schreckenberger, P.C.: Community-acquired and clindamycin-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children. *Pediatr Infect Dis J*, 18: 993-1000. (1999).
- Frankenburg, E., Goldstein, S., Bauer, T., Harris, S. und Poser, R.: Biomechanical and histological evaluation of a calcium phosphate cement. *J Bone Joint Surg*, 80A: 1112-1124 (1998).
- Frayssinet, P., Mathon, D., Lerch, A., Autefage, A., Collard, P. und Rouquet, N.: Osseointegration of composite calcium phosphate bioceramics. *J Biomed Mater Res*, 50: 125-30. (2000).
- Friedlaender, G. und Horowitz, M.: Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance. *Orthopedics*, 15: 1-5 (1992).
- Friedlaender, G.E.: Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin Orthop*, 58-68. (1983).
- Friedman, G.D., Gerard, M.J. und Ury, H.K.: Clindamycin and diarrhea. *Jama*, 236: 2498-500. (1976).
- Frost, H.M.: The origin and nature of transients in human bone remodeling dynamics. In: Frame B., Parfitt AM., Duncan H.: *Clinical aspects of metabolic bone disease. Excerpta Medica, Amsterdam*, 43-8 (1973).
- Gemmell, C.G.: Clindamycin and its action on the susceptibility of pathogenic bacteria to phagocytosis. *Scand J Infect Dis Suppl*, 43: 17-23 (1984).
- Gerlach, K.L. und Niehuses, D.: [Treatment of jaw cysts with a new kind of nanoparticulate hydroxyapatite]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 11: 131-7 (2007a).
- Gerlach, K.L. und Niehuses, D.: [Treatment of jaw cysts with a new kind of nanoparticulate hydroxylapatite]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 11: 131-7 (2007b).
- Gismondo, M.R., Chisari, G., Lo Bue, A.M. und Lupo, G.: Effect of clindamycin on adherence of coagulase-negative *Staphylococcus* to surgical nets. *G Chir*, 11: 234-7. (1990).
- Gitelis, S. und Brebach, G.T.: The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 10: 53-60. (2002).

- Goldberg, M., Lys-Masanés, I., De Laverne, E., Lacoudre, N., Le Denmat, D. und Montluçon, J.: [Surface treatment of mineralized tissue: different approaches and prospects]. *Rev Orthop Dento Faciale*, **25**: 19-34 (1991).
- Goldberg, V.M.: Selection of bone grafts for revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop*, 68-76. (2000).
- Goldberg, V.M., Shaffer, J.W., Field, G. und Davy, D.T.: Biology of vascularized bone grafts. *Orthop Clin North Am*, **18**: 197-205. (1987).
- Goldberg, V.M. und Stevenson, S.: Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop*, 7-16. (1987).
- Goldberg, V.M. und Stevenson, S.: The biology of bone grafts. *Semin Arthroplasty*, **4**: 58-63. (1993).
- Golembiewski, J.A.: Allergic reactions to drugs: implications for perioperative care. *J Perianesth Nurs*, **17**: 393-8. (2002).
- Gosain, A.K., Song, L., Riordan, P., Amarante, M.T., Nagy, P.G., Wilson, C.R., Toth, J.M. und Ricci, J.L.: A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg*, **109**: 619-30. (2002).
- Gospodarowicz, D., Neufeld, G. und Schweigerer, L.: Fibroblast growth factor. *Mol Cell Endocrinol*, **46**: 187-204. (1986).
- Gray und Lewis: *Toxicol Appl Pharmacol*, **8**: 342 (1966).
- Grieben, A.: Treatment of bone and soft-tissue infections with gentamicin-polymethylmethacrylate chains. A review of clinical trials involving 1 500 cases. *S Afr Med J*, **60**: 395-7. (1981).
- Griffith L. J., O.W.W., Mullins C. G., et al.: Drug antagonism between lincomycin and erythromycin. *Science*, **147**: 746--7 (1965).
- Grzybowski, J., Kolodziej, W., Trafny, E.A. und Struzyna, J.: A new anti-infective collagen dressing containing antibiotics. *J Biomed Mater Res*, **36**: 163-6. (1997).
- Guenther, K.P., Scharf, H.P., Pesch, H.J. und Puhl, W.: [Integration properties of bone substitute materials. Experimental studies on animals]. *Orthopäde*, **27**: 105-17. (1998).
- Guillemin, G., Meunier, A., Dallant, P., P., C., Pouliguen, J.C. und Sedel, L.: Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. *J Biomed Mater Res*, **23**: 765-77 (1989).
- Gunther, K.P., Scharf, H.P., Pesch, H.J. und Puhl, W.: [Integration properties of bone substitute materials. Experimental studies on animals]. *Orthopäde*, **27**: 105-17. (1998).
- Haas, D.W. und McAndrew, M.P.: Bacterial osteomyelitis in adults: evolving considerations in diagnosis and treatment. *Am J Med*, **101**: 550-61 (1996).
- Hadjipavlou, A.G., Simmons, J.W., Tzermiadianos, M.N., Katonis, P.G. und Simmons, D.J.: Plaster of Paris as bone substitute in spinal surgery. *Eur Spine J*, **10 Suppl 2**: S189-96. (2001).

- Hadjipavlou, A.G., Simmons, J.W., Yang, J., Nicodemus, C.L., Esch, O. und Simmons, D.J.: Plaster of Paris as an osteoconductive material for interbody vertebral fusion in mature sheep. *Spine*, **25**: 10-5; discussion 16. (2000).
- Halloran, P., Lee, E., Ziv, I., Langer, F. und Gross, A.: Orthotopic bone transplantation in mice. II. Studies of the alloantibody response. *Transplantation*, **27**: 420-6 (1979).
- Halloran, P., Ziv, I., Lee, E., Langer, F., Pritzker, K. und Gross, A.: Orthotopic bone transplantation in mice. I. Technique and assessment of healing. *Transplantation*, **27**: 414-9 (1979).
- Hand, W.L. und King-Thompson, N.L.: Contrasts between phagocyte antibiotic uptake and subsequent intracellular bactericidal activity. *Antimicrob Agents Chemother*, **29**: 135-40. (1986).
- Harrison, H.R., Riggin, R.M., Alexander, E.R. und Weinstein, L.: In vitro activity of clindamycin against strains of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum* isolated from pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*, **149**: 477-80. (1984).
- Heinz, B. und S., J.: Ostim for the intrabony periodontal defects: a randomized controlled clinical study. *J Clin Periodontol*, **33**: 53 (2006).
- Heiple, K.G., Goldberg, V.M., Powell, A.E., Bos, G.D. und Zika, J.M.: Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am*, **18**: 179-85. (1987).
- Heisel, J.: Tierexperimentelle Untersuchungen zur Kallusformation durch Hydroxylapatit-Injektion. *Unfallchirurgie*, **13**: 179-86 (1987).
- Helber, M.U. und Ulrich, C.: [Metaphyseal defect substitute: hydroxylapatite ceramic. Results of a 3 to 4 year follow up]. *Unfallchirurg*, **103**: 749-53. (2000).
- Hench, L.L., Splinter, R.J., Allen, W.C. und Greelee, T.K.: Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J Biomed Mater Res*, **2**: 117-41 (1971).
- Hench, L.L. und Wilson, J.: Surface-active materials. *Biomater Sci*, **226**: 630-6 (1984).
- Hernigou, P., Marinello, G. und Dormont, D.: [Influence of irradiation on the risk of HIV virus transmission by bone allograft]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, **84**: 493-500. (1998).
- Hernigou, P.H., Glorion, C.H., Girard-Pipau, F. und Goutallier, D.: Antibiotic impregnated bone graft, transfer and activity of antibiotics in viro and in vivo. *J of Bone Joint Surg*, **73B**: 185-6 (1991).
- Hinthorn, D.R., Baker, L.H., Romig, D.A., Hassanein, K. und Liu, C.: Use of clindamycin in patients with liver disease. *Antimicrob Agents Chemother*, **9**: 498-501. (1976).
- Hlady, V. und Furdi-Milhofer, H.: Adsorption of human serum albumin on precipitated hydroxyapatite. *J Coll Interf Sci*, **69**: 460-8 (1978).
- Hofmann, G.O., Falk, C. und Wangemann, T.: Immunological transformations in the recipient of grafted allogeneic human bone. *Arch Orthop Trauma Surg*, **116**: 143-50 (1997).

- Holmes, R., Mooney, V., Bucholz, R. und Tencer, A.: A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. *Clin Orthop*, **188**: 252-62 (1984).
- Holmes, R.E., Bucholz, R.W. und Mooney, V.: Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. *J Orthop Res*, **5**: 114-21 (1987).
- Horas, U., Heiss, C., Stahl, J.-P., Kilian, O. und Schnettler, R.: Die Knorpel-Knochen-Transplantation. Ein geeignetes Therapieverfahren zur Behandlung tiefreichender Knorpelschäden. *Osteo traum care*, **9**: 40-44 (2001).
- Horowitz, M. und Friedlaender, G.: Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *Orthop Clin North Am*, **18**: 227-33 (1987).
- Horowitz, M. und Friedländer, G.: Induction of specific T-cell responsiveness to allogenic bone. *J Bone Joint Surg Am*, **73**: 1157-68 (1991).
- Huber, F.X., Belyaev, O., Hillmeier, J., Kock, H.J., Huber, C., Meeder, P.J. und Berger, I.: First histological observations on the incorporation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste OSTIM in human cancellous bone. *BMC Musculoskelet Disord.*, **7**: 50 (2006a).
- Huber, F.X., Berger, I., McArthur, N., Huber, C., Kock, H.P., Hillmeier, J. und Meeder, P.J.: Evaluation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste and a solid hydroxyapatite ceramic for the treatment of critical size bone defects (CSD) in rabbits. *J Mater Sci Mater Med*, **19**: 33-8 (2008).
- Huber, F.X., Hillmeier, J., Herzog, L., McArthur, N., Kock, H.J. und Meeder, P.J.: Open reduction and palmar plate-osteosynthesis in combination with a nanocrystalline hydroxyapatite spacer in the treatment of comminuted fractures of the distal radius. *J Hand Surg [Br]*. **31**: 298-303 (2006b).
- Huber, F.X., Hillmeier, J., McArthur, N., Kock, H.J. und Meeder, P.J.: The use of nanocrystalline hydroxyapatite for the reconstruction of calcaneal fractures: Preliminary results. *J Foot Ankle Surg*, **45**: 322-8 (2006c).
- Huber, F.X., McArthur, N., Hillmeier, J., Kock, H.J., Baier, M., Diwo, M., Berger, I. und Meeder, P.J.: Void filling of tibia compression fracture zones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in combination with a hydroxyapatite ceramic core: first clinical results. *Arch Orthop Trauma Surg.*, **126**: 533-40 (2006d).
- Huber, F.X., McArthur, N., Hillmaeter, J., Kock, H.J., Baier, M., Diwo, M., Berger, I. und Meeder, P.J.: Void filling of tibia compression fracture zones using a novel resorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in combination with a hydroxyapatite ceramic core; first clinical results. *Arch Orthop Trauma Surg*, **126**: 533-40 (2006d).
- Hudson, M.C., Ramp, W.K. und Frankenburg, K.P.: Staphylococcus aureus adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. *FEMS Microbiol Lett*, **173**: 279-84. (1999).
- Hulth, A.: Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop*, 265-84. (1989).
- Humphrey, J.S., Mehta, S., Seaber, A.V. und Vail, T.P.: Pharmacokinetics of a degradable drug delivery system in bone. *Clin Orthop*, 218-24. (1998).

- Ichimiya, T., Yamasaki, T. und Nasu, M.: In-vitro effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*, **34**: 331-41. (1994).
- Inaba, K., Matsunaga, S., Ishidou, Y., Imamura, T. und Yoshida, H.: Effect of transforming growth factor-beta on fibroblasts in ossification of the posterior longitudinal ligament. *In Vivo*, **10**: 445-9. (1996).
- Ingham, E., Green, T.R., Stone, M.H., Kowalski, R., Watkins, N. und Fisher, J.: Production of TNF-alpha and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles. *Biomaterials*, **21**: 1005-13. (2000).
- Inoue, K., Ohgushi, H., Yoshikawa, T., Okumura, M., Sempuku, T., Tamai, S. und Dohi, Y.: The effect of aging on bone formation in porous hydroxyapatite: biochemical and histological analysis. *J Bone Miner Res*, **12**: 989-94. (1997).
- Ipsen, T., Jorgensen, P.S., Damholt, V. und Torholm, C.: Gentamicin-collagen sponge for local applications. 10 cases of chronic osteomyelitis followed for 1 year. *Acta Orthop Scand*, **62**: 592-4. (1991).
- Isefuku, S., Joyner, C.J. und Simpson, A.H.: Gentamicin May Have an Adverse Effect on Osteogenesis. *J Orthop Trauma*, **17**: 212-216. (2003).
- Jackson, S.F.: The fine structure of developing bone in the embryonic fowl. *Proc Roy Soc London, Ser B*, **146**: 270-80 (1957).
- Jacob, E., Setterstrom, J.A., Bach, D.E., Heath, J.R., McNiesh, L.M. und Cierny, G.: Evaluation of biodegradable ampicillin anhydrate microcapsules for local treatment of experimental staphylococcal osteomyelitis. *Clin Orthop Rel Res*, **267**: 237-44 (1991).
- Jacobs, R.F. und Wilson, C.B.: Intracellular penetration and antimicrobial activity of antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, **12 Suppl C**: 13-20. (1983).
- Jamali, A., Hilpert, A., Debes, J., Afshar, P., Rahban, S. und Holmes, R.: Hydroxyapatite/calcium carbonate (HA/CC) vs. plaster of Paris: a histomorphometric and radiographic study in a rabbit tibial defect model. *Calcif Tissue Int*, **71**: 172-8. (2002).
- Jarcho, M.: Retrospective analysis of hydroxyapatite development for oral implant applications. *Dent Clin North Am*, **36**: 19-26 (1992).
- Jensen, S.S., Aaboe, M., Pinholt, E.M., Hjorting-Hansen, E., Melsen, F. und Ruyter, I.E.: Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **11**: 55-66. (1996).
- Jiranek, W.A., Machado, M., Jasty, M. und al., e.: Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. *J Bone Joint Surg*, **75A**: 863-79 (1993).
- Johnson, J.D., Hand, W.L., Francis, J.B., King-Thompson, N. und Corwin, R.W.: Antibiotic uptake by alveolar macrophages. *J Lab Clin Med*, **95**: 429-39. (1980).
- Joschek, S., Nies, B., Krotz, R. und Goferich, A.: Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials*, **21**: 1645-58. (2000).

- Joyce, M.E., Terek, R.M., Jingushi, S. und Bolander, M.E.: Role of transforming growth factor-beta in fracture repair. *Ann N Y Acad Sci*, **593**: 107-23 (1990).
- Junqueira, I.C. und Carneiro, J.: Histologie. (1996).
- Kahlmeter, G.: Gentamicin and tobramycin, clinical pharmacokinetics and nephrotoxicity: aspects on assay techniques. *Scand J Infect Dis*, **18**: 12-22 (1979).
- Kamegai, A., Shimamura, N., Naitou, K., Nagahara, K., Kanematsu, N. und Mori, M.: Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/self-setting apatite cement composite as a delivery system. *Biomed Mater Eng*, **4**: 291-307 (1994).
- Kanellakopoulou, K., Galanakis, N., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Rifiotis, C., Papakostas, K., Andreopoulos, A., Dounis, E., Karagianakos, P. und Giamarellou, H.: Treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a biodegradable system of lactic acid polymer releasing pefloxacin. *J Antimicrob Chemother*, **46**: 311-4. (2000).
- Kanellakopoulou, K. und Giamarellos-Bourboulis, E.J.: Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections. *Drugs*, **59**: 1223-32. (2000).
- Kano, S., Ymazaki, A., Otsuka, R., Ohgaki, M., Akao, M. und Aoki, H.: Application of hydroxyapatite-sol as drug carrier. *Biomed Mater Eng*, **4**: 283-90 (1994).
- Kaplan, S.L., Mason, E.O., Jr. und Feigin, R.D.: Clindamycin versus nafcillin or methicillin in the treatment of *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in children. *South Med J*, **75**: 138-42. (1982).
- Karlsson, K.H.: Bone implants--a challenge to materials science. *Ann Chir Gynaecol*, **88**: 226-35 (1999).
- Kasaj, A., Rohrig, B., Zafiropoulos, G.G. und Willershausen, B.: Clinical evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite paste in the treatment of human periodontal bony defects--a randomized controlled clinical trial: 6-month results. *J Periodontol*, **79**: 394-400 (2008).
- Kato, H., Nishiguchi, S., Furukawa, T., Neo, M., Kawanabe, K., Saito, K. und Nakamura, T.: Bone bonding in sintered hydroxyapatite combined with a new synthesized agent, TAK-778. *J Biomed Mater Res*, **54**: 619-29. (2001).
- Katsura, N.: Nanospace theory for biomineralization. *Dentistry in Japan*, **27**: 57-63 (1990).
- Kawanabe, K., Okada, Y., Matsusue, Y., Iida, H. und Nakamura, T.: Treatment of osteomyelitis with antibiotic-soaked porous glass ceramic. *J Bone Joint Surg Br*, **80**: 527-30. (1998).
- Kelkar, P.S. und Li, J.T.: Cephalosporin allergy. *N Engl J Med*, **345**: 804-9. (2001).
- Kelly, C.M., Wilkins, R.M., Gitelis, S., Hartjen, C., Watson, J.T. und Kim, P.T.: The use of a surgical grade calcium sulfate as a bone graft substitute: results of a multicenter trial. *Clin Orthop*, 42-50. (2001).
- Kendall, R.W., Duncan, C.P., Smith, J.A. und Ngui-Yen, J.H.: Persistence of bacteria on antibiotic loaded acrylic depots. A reason for caution. *Clin Orthop*, 273-80. (1996).



- Kent, J.N., Zide, M.R., Kay, J.F. und Jarcho, M.: Hydroxyapatite blocks and particles as bone graft substitutes in orthognatic and reconstructive surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, **44**: 597-605 (1986).
- Khardori, N., Wong, E., Nguyen, H., Jeffery-Wiseman, C., Wallin, E., Tewari, R.P. und Bodey, G.P.: Effect of subinhibitory concentrations of clindamycin and trospectomycin on the adherence of Staphylococcus epidermidis in an in vitro model of vascular catheter colonization. *J Infect Dis*, **164**: 108-13. (1991).
- Kilian, O., Wenisch, S., Heiss, C., Horas, U., Dingeldein, E. und Schnettler, R.: Einfluss von Ostim kombiniert mit autologen thrombozytären Wachstumsfaktoren. *Biomaterialien, Sonderdruck*, **3 (3/4)**: (2002).
- Kim, H.W., Gu, H.J. und Lee, H.H.: Microspheres of collagen-apatite nanocomposites with osteogenic potential for tissue engineering. *Tissue Eng*, **13**: 965-73 (2007).
- Kitamura, H., Kawata, H., Takahashi, F., Higuchi, Y., Furuichi, T. und Ohkawa, H.: Bone marrow neutrophilia and suppressed bone turnover in human interleukin-6 transgenic mice. A cellular relationship among hematopoietic cells, osteoblasts, and osteoclasts mediated by stromal cells in bone marrow. *Am J Pathol*, **147**: 1682-92. (1995).
- Klawitter, J.J. und Hulbert, S.F.: Application of porous ceramics for the attachmnet of load bearing internal orthopedic application. *J Biomed Res*, **2**: 161 (1971).
- Klein, C.P.A.T., Driessen, A.A. und de Groot, K.: Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue. *J Biomed Mat Res*, **17**: 769-84 (1983).
- Klein, L., Stevenson, S., Shaffer, J.W., Davy, D. und Goldberg, V.M.: Bone mass and comparative rates of bone resorption and formation of fibular autografts: comparison of vascular and nonvascular grafts in dogs. *Bone*, **12**: 323-9 (1991).
- Klemm, K.: [Gentamicin-PMMA-beads in treating bone and soft tissue infections (author's transl)]. *Zentralbl Chir*, **104**: 934-42 (1979a).
- Klemm, K.: [Indication for and technic of gentamycin-PMMA-spheres insertion in bone and soft tissue defects]. *Aktuelle Probl Chir Orthop*, **12**: 121-7 (1979b).
- Klemm, K.: The use of antibiotic-containing bead chains in the treatment of chronic bone infections. *Clin Microbiol Infect*, **7**: 28-31. (2001).
- Klemm, K. und Borner, M.: [Treatment of chronic osteomyelitis with gentamicin PMMA chains]. *Unfallchirurgie*, **12**: 128-31. (1986).
- Klempner, M.S. und Styrt, B.: Clindamycin uptake by human neutrophils. *J Infect Dis*, **144**: 472-9. (1981).
- Klepser, M.E., Nicolau, D.P., Quintiliani, R. und Nightingale, C.H.: Bactericidal activity of low-dose clindamycin administered at 8- and 12- hour intervals against Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, and Bacteroides fragilis. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**: 630-5. (1997).
- Klinge, B., Alberius, P., Isaksson, S. und Jönsson, J.: Osseous Response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the rapair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg*, **50**: 241-9 (1992).

- Knaack, D., Goad, M.E., Aiolo, M., Rey, C., Tofighi, A., Chakravarthy, P. und Lee, D.D.: Resorbable calcium phosphate bone substitute. *J Biomed Mater Res*, **43**: 399-409. (1998).
- Kopylov, P., Jonsson, K., Thorngren, K.G. und Aspenberg, P.: Injectable calcium phosphate in the treatment of distal radial fractures. *J Hand Surg [Br]*, **21**: 768-71. (1996).
- Kopylov, P., Runnqvist, K., Jonsson, K. und Aspenberg, P.: Norian SRS versus external fixation in redisplaced distal radial fractures. A randomized study in 40 patients. *Acta Orthop Scand*, **70**: 1-5. (1999).
- Kopylov, P., Tagil, M. und Aspenberg, P.: Delayed surgery does not reduce the interface strength between the surface of a bone fracture and a self-curing injectable hydroxyapatite (Norian SRS). *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, **35**: 129-33. (2001).
- Korkusuz, F., Uchida, A., Shinto, Y., Araki, N., Inoue, K. und Ono, K.: Experimental implant-related osteomyelitis treated by antibiotic-calcium hydroxyapatite ceramic composites. *J Bone Joint Surg Br*, **75**: 111-4. (1993).
- Korkusuz, F. und Uluoglu, Ö. Non-specific inflammation and bone marrow depletion due to intramedullary porous hydroxyapatite application. *Hospital for Joint Diseases*, **58**: 86-91 (1999).
- Korn, S.J. und Shah, P.M.: In-vitro-Aktivität von Quinupristin/Dalfopristin im Vergleich zu anderen antimikrobiellen Substanzen gegen *Staphylococcus aureus* isoliert aus Blutkulturen. *Chemother J*, **4**: 146-9 (1999).
- Korn, S.J. und Shah, P.M.: In-vitro-Aktivität von Linezolid gegen *Staphylococcus* species im Vergleich zu anderen Antibiotika. *Chemother J*, **11**: 87-9 (2002).
- Kowalsky, S.F., Echols, R.M. und McCormick, E.M.: Comparative serum bactericidal activity of ceftizoxime/metronidazole, ceftizoxime, clindamycin, and imipenem against obligate anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother*, **25**: 767-75. (1990).
- Kregelez, G., Drucker, J. und Fabinger, A.: Die Einheilung des Spongiosatransplantates in der paradontalen Knochentasche. *Dtsch Zahnärztl Z*, **34**: 313-6 (1979).
- Kubler, N.R.: [Osteoinduction and -reparation]. *Mund Kiefer Gesichtschir*, **1**: 2-25. (1997).
- Kurioka, K., Umeda, M., Teranobu, O. und Komori, T.: Effect of various properties of hydroxyapatite ceramics on osteoconduction and stability. *Kobe J Med Sci*, **45**: 149-63. (1999).
- Kuznetsov, S. A., Mankani, M.H. und Robey, P.G.: Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation*, **70**: 1780-7. (2000).
- Labella, R., Braden, M. und Deb, S.: Novel Hydroxyapatite based dental composites. *Biomaterials*, **15**: 1197-200 (1994).
- Lacroix, P.: Recent investigations in the growth of bone. *Nature*, **156**: 576-81 (1945).

- Lambotte, J.C., Thomazeau, H., Cathelineau, G., Lancien, G., Minet, J. und Langlais, F.: Tricalcium phosphate, an antibiotic carrier: A study focused on experimental osteomyelitis in rabbits. *Chirurgie*, **123**: 572-9. (1998).
- Laschke, M.W., Witt, K., Pohlemann, T. und Menger, M.D.: Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, **82**: 494-505 (2007).
- Lauer, M.: *Untersuchungen zum Einfluss von thrombozytären Wachstumsfaktoren auf den zellvermittelten Abbau eines nanopartikulären Knochenersatzstoffes auf Hydroxylapatitbasis - eine experimentelle Studie am Miniaturschwein*. Justus-Liebig-Universität Gießen, Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie. Fachbereich Veterinärmedizin., Giessen. (2006).
- Laurencin, C.T., Gerhart, T., Witschger, P., Satcher, R., Domb, A., Rosenberg, A.E., Hanff, P., Edsberg, L., Hayes, W. und Langer, R.: Bioerodible polyanhydrides for antibiotic drug delivery: in vivo osteomyelitis treatment in a rat model system. *J Orthop Res*, **11**: 256-62. (1993).
- Lee, D.D., Tofighi, A., Aiolo, M., Chakravarthy, P., Catalano, A., Majahad, A. und Knaack, D.: alpha-BSM: a biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle. *Clin Orthop*, S396-405. (1999).
- Lee, M.Y., Finn, H.A., Lazda, V.A., Thistlethwaite, J.R., Jr. und Simon, M.A.: Bone allografts are immunogenic and may preclude subsequent organ transplants. *Clin Orthop*, 215-9. (1997).
- Lee, Y.M., Park, Y.J., Lee, S.J., Ku, Y., Han, S.B., Klokkevold, P.R. und Chung, C.P.: The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol*, **71**: 418-24. (2000).
- LeFrock, J.L., Molavi, A. und Prince, R.A.: Clindamycin. *Med Clin North Am*, **66**: 103-20. (1982).
- LeGeros, R.Z.: Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics. *Clin Mater*, **14**: 65-88 (1993).
- LeGeros, R.Z.: Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop*, 81-98. (2002).
- Lehtinen, R., Kuusilehto, A. und Nikkanen, U.-M.: Bone response to hydroxyapatite particles of different shapes in rabbit tibia. *J Oral Maxillofac Surg*, **48**: 1075-8 (1990).
- Lemmen, S., Kropec, A., Engels, I., Busse, A. und Daschner, F.D.: MIC and serum bactericidal activity of clindamycin against methicillin-resistant and -sensitive staphylococci. *Infection*, **21**: 407-9. (1993).
- Letsch, R., Rosenthal, E. und Joka, T.: [Local antibiotic administration in osteomyelitis treatment--a comparative study with two different carrier substances]. *Aktuelle Traumatol*, **23**: 324-9. (1993).
- Levison, M.E.: Pharmacodynamics of antibacterial drugs. *Infect Dis Clin North Am*, **14**: 281-91, vii. (2000).
- Lew, D.P. und Waldvogel, F.A.: Osteomyelitis. *N Engl J Med*, **336**: 999-1007. (1997).

- Lexner, E.: Über freie Transplantationen. *Langenbeck's Arch. klin. Chir.*, **95**: 827-51 (1911).
- Li, T., Takikawa, K., Yoshizawa, K., Sakatsume, M. und Aoki, H.: Reaction of hydroxyapatite-sol in bone marrow. *Biomed Mater Eng*, **5**: 83-92 (1995).
- Li, X.D. und Hu, Y.Y.: The treatment of osteomyelitis with gentamicin-reconstituted bone xenograft-composite. *J Bone Joint Surg Br*, **83**: 1063-8. (2001).
- Li, Y., De Wijn, J.R., Klein, C.P.A.T., v. d. Meer, S. und de Groot, K.: Preparation and characterisation of nano-grade osteoapatite-like rod crystals. *J Mater Sci Mater in Med*, 252-5 (1994).
- Liao, H., Mutvei, H., Hammarstrom, L., Wurtz, T. und Li, J.: Tissue responses to nacreous implants in rat femur: an in situ hybridization and histochemical study. *Biomaterials*, **23**: 2693-701. (2002).
- Liebendörfer, A. und Troster, S.: Hydroxylapatitkeramik im klinischen Einsatz. *Unfallchirurgie*, **23**: 60-8. (1997).
- Liebendörfer, A. und Tröster, S.: Hydroxylapatitkeramik im klinischen Einsatz. *Unfallchirurgie*, **23**: 60-68 (1997).
- Lilley, K.J., Gbureck, U., Wright, A.J., Farrat, D.F. und Barralet, J.E.: Cement from nanocrystalline hydroxyapatite: effect of calcium phosphate ratio. *J Mater Sci Mater Med*, **16**: 1185-90 (2005).
- Lindsey, R.W., Probe, R., Miclau, T., Alexander, J.W. und Perren, S.M.: The effects of antibiotic-impregnated autogeneic cancellous bone graft on bone healing. *Clin Orthop*, 303-12. (1993).
- Liu, Q., de Wijn, J.R., de Groot, K. und van Blitterswijk, C.A.: Surface modification of nano-apatite by grafting organic polymer. *Biomaterials*, **19**: 1067-72. (1998).
- Liu, S.J., Wen-Neng Ueng, S., Lin, S.S. und Chan, E.C.: In vivo release of vancomycin from biodegradable beads. *J Biomed Mater Res*, **63**: 807-13 (2002).
- Lohmann, C.H., Andreacchio, D., Koster, G., Carnes, D.L., Jr., Cochran, D.L., Dean, D.D., Boyan, B.D. und Schwartz, Z.: Tissue response and osteoinduction of human bone grafts in vivo. *Arch Orthop Trauma Surg*, **121**: 583-90. (2001).
- Lorenzetti, O.J., Fortenberry, B. und Busby, E.: Influence of microcrystalline collagen in wound healing. II. Comparison of several collagen dressings on excised wounds of pigs and rabbits. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, **5**: 431-40. (1973).
- Ma, S., Yang, Y., Carnes, D., King, K., Park, S., Oh, S. und Ong, J.: Effects of dissolved calcium and phosphorous on osteoblast responses. *J Oral Implantol.*, **31**: 61-67 (2005).
- Mackey, D., Varlet, A. und Debeaumont, D.: Antibiotic loaded plaster of Paris pellets: an in vitro study of a possible method of local antibiotic therapy in bone infection. *Clin Orthop*, 263-8. (1982).
- Mackowiack, P.A., Jones, S.R. und Smith, J.W.: Diagnostic value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. *JAMA*, **239**: 2772-5 (1978).
- Macy, E.: Cephalosporin allergy. *N Engl J Med*, **346**: 380-1. (2002).

- Mader, J.T., Adams, K. und Morrison, L.: Comparative evaluation of cefazolin and clindamycin in the treatment of experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother*, **33**: 1760-4. (1989).
- Mader, J.T., Calhoun, J. und Musher, D.M.: In vitro evaluation of antibiotic diffusion from antibiotic-impregnated biodegradable beads and polymethylmethacrylate beads. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**: 415-8 (1997).
- Mader, J.T., Ortiz, M. und Calhoun, J.H.: Update on the diagnosis and management of osteomyelitis. *Clin Podiatr Med Surg*, **13**: 701-24. (1996).
- Mader, J.T., Shirliff, M.E., Bergquist, S.C. und Calhoun, J.: Antimicrobial treatment of chronic osteomyelitis. *Clin Orthop*, 47-65. (1999).
- Mader, J.T., Stevens, C.M., Stevens, J.H., Ruble, R., Lathrop, J.T. und Calhoun, J.H.: Treatment of experimental osteomyelitis with a fibrin sealant antibiotic implant. *Clin Orthop*, 58-72. (2002).
- Magerlein, B.J., Birkenmeyer, R.D. und Kagan, F.: Chemical modification of lincomycin. *Antimicrobial Agents Chemother*, **6**: 727-36 (1966).
- Mahan, J., Seligson, D., Henry, S.L. und al., e.: Factors in pin-tract infections. *Orthopedics*, **14**: 305-8 (1991).
- Mahy, P.R. und Urist, M.R.: Experimental heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein and recombinant human IL-1B. *Clin Orthop*, **237**: 236-44 (1988).
- Mandelkow, H.K., Hallfeldt, K.K., Kessler, S.B., Gayk, M., Siebeck, M. und Schweiberer, L.: [New bone formation following implantation of various hydroxyapatite ceramics. Animal experiment with bore hole models of the sheep tibia]. *Unfallchirurg*, **93**: 376-9. (1990).
- Mankin, H.J., Doppelt, S. und Tomford, W.: Clinical experience with allograft implantation. The first ten years. *Clin Orthop*, 69-86. (1983).
- Marks, K.E., Nelson, C.L. und Lautenschlager, E.P.: Antibiotic-impregnated acrylic bone cement. *J Bone Joint Surg Am*, **58**: 358-64. (1976).
- Marx, R.E. und Carlson, E.R.: Tissue banking safety: caveats and precautions for the oral and maxillofacial surgeon. *J Oral Maxillofac Surg*, **51**: 1372-9. (1993).
- Mascellino, M.T., De Vito, M.L., Maclean Feeney, E., Iegri, F. und Catania, S.: Phagocytosis and killing of A-protein positive *Staphylococcus aureus* in the presence of low doses of antibiotics. *Drugs Exp Clin Res*, **15**: 63-9 (1989).
- Matsumoto, T., Kawakami, M., Kuribayashi, K., Takenaka, T., Minamide, A. und Tamaki, T.: Effects of sintered bovine bone on cell proliferation, collagen synthesis, and osteoblastic expression in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Orthop Res*, **17**: 586-92. (1999).
- Mayberry-Carson, K.J., Tober-Meyer, B., Lambe, D.W., Jr. und Costerton, J.W.: An electron microscopic study of the effect of clindamycin therapy on bacterial adherence and glycocalyx formation in experimental *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Microbios*, **48**: 189-206 (1986).
- Mayorga, C., Torres, M.J. und Blanca, M.: Cephalosporin allergy. *N Engl J Med*, **346**: 380-1. (2002).

- Mc David, P.T., Boone, M.E., Kafray, A.H. und Mitchell, D.F.: Effect of autogenous marrow and calcitonin on reactions to a ceramic. *J Dent Res*, **58**: 478 (1979).
- McLaren, A.C. und Miniaci, A.: In vivo study to determine the efficacy of cancellous bone graft as a delivery vehicle for antibiotics. In: *In Transactions of the Twelfth Annual Meeting of the Society for Biomaterials*, p 102. Society for Biomaterials, Minneapolis, MN (1986).
- Mellonig, J.T., Prewett, A.B. und Moyer, M.P.: HIV inactivation in a bone allograft. *J Periodontol*, **63**: 979-83. (1992).
- Miclau, T., Dahners, L.E. und Lindsey, R.W.: In vitro pharmacokinetics of antibiotic release from locally implantable materials. *J Orthop Res*, **11**: 627-32. (1993).
- Miclau, T., Edin, M.L., Lester, G.E., Lindsey, R.W. und Dahners, L.E.: Bone toxicity of locally applied aminoglycosides. *J Orthop Trauma*, **9**: 401-6 (1995).
- Miki, T., Masaka, K., Imai, Y. und Enomoto, S.: Experience with freeze-dried PGLA/HA/rhBMP-2 as a bone graft substitute. *J Craniomaxillofac Surg*, **28**: 294-9. (2000).
- Milatovic, D., Braveny, I. und Verhoef, J.: Clindamycin enhances opsonization of Staphylococcus aureus. *Antimicrob Agents Chemother*, **Sep**: 413-7 (1983).
- Miller, E.L.: The penicillins: a review and update. *J Midwifery Womens Health*, **47**: 426-34. (2002).
- Minguell, J.J., Conget, P. und Erices, A.: Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res*, **33**: 881-7. (2000).
- Mirzayan, R., Panossian, V., Avedian, R., Forrester, D.M. und Menendez, L.R.: The use of calcium sulfate in the treatment of benign bone lesions. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*, **83-A**: 355-8. (2001).
- Misch, C.E. und Dietsh, F.: Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent*, **2**: 158-67. (1993).
- Misra, D.N.: Adsorption of low molecular weight poly(acrylic acid) on hydroxyapatite: role of molecular association and apatite dissolution. *Langmuir*, **7**: 2422-4 (1991).
- Mittelmeier, H., Mittelmeier, W. und Gleitz, M.: [Pyrost, a spongius, mineral bone substitute. Experimental bases and 13-year clinical experience in over 1000 cases]. *Orthopäde*, **27**: 126-35. (1998).
- Moghadam, H.G., Sandor, G.K., Homes, H.H. und Clokie, C.M.: Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Oral Maxillofac Surg*, **62**: 202-13 (2004).
- Morax, S., Hurbli, T. und Smida, R.: [Bovine heterologous bone graft in orbital surgery]. *Ann Chir Plast Esthet*, **38**: 445-50. (1993).
- Muehleman, C., Kuettner, K.E., Rueger, D.C., Ten Dijke, P. und Chubinskaya, S.: Immunohistochemical localization of osteogenetic protein (OP-1) and its receptors in rabbit articular cartilage. *J Histochem Cytochem*, **50**: 1341-50. (2002).

- Müller, R., Wichmann, G. und Haufe, E.: Antibakterielle Wirksamkeit von Clindamycin bei chronisch-rezidivierender Tonsillitis. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **46**: 534-38 (1996).
- Müller, S.C., Henkel, K.O., Neumann, J., Hehl, E.M., Gundlach, K.K. und Drewelow, B.: Perioperative antibiotic prophylaxis in maxillofacial surgery: penetration of clindamycin into various tissues. *J Craniomaxillofac Surg*, **27**: 172-6 (1999).
- Müller-Mai, C.M., Stupp, S.I., Voigt, C. und Gross, U.: Nanoapatite and organoapatite implants in bone: histology and ultrastructure of the interface. *J Biomed Mater Res*, **29**: 9-18 (1995).
- Murakami, J., Kishi, K., Hirai, K., Hiramatsu, K., Yamasaki, T. und Nasu, M.: Macrolides and clindamycin suppress the release of Shiga-like toxins from *Escherichia coli* O157:H7 in vitro. *Int J Antimicrob Agents*, **15**: 103-9. (2000).
- Muscolo, D.L., Caletti, E., Schajowicz, F., Araujo, E.S. und Makino, A.: Tissue-typing in human massive allografts of frozen bone. *J Bone Joint Surg Am*, **69**: 583-95. (1987).
- Nagashimi, T., Oshima, X. und Takeuchi, H.: Osteoconduction in porous hydroxyapatite ceramics grafted the defect in lamina in experimental miniplastics. *Jpn Orthop Assoc*, **69**: (1995).
- Nagelschmidt, M. und Struck, H.: [Effect of exogenous collagen on the metabolism of rat burns]. *Chirurg*, **49**: 448-51. (1978).
- Naumann, G.: Zur Mikrobiologie der Lincomycine. *Symposium: Einsatzmöglichkeiten der Lincomycin-Antibiotika - Berlin*, (1985).
- Nelson, C., Hickmon, S. und Harrison, B.: Elution characteristics of gentamicin-PMMA beads after implantation in humans. *Orthopedics*, **17**: 415-6 (1994).
- Nelson, C.L., Evans, R.P., Blaha, J.D., Calhoun, J., Henry, S.L. und Patzakis, M.J.: A comparison of gentamicin-impregnated polymethylmethacrylate bead implantation to conventional parenteral antibiotic therapy in infected total hip and knee arthroplasty. *Clin Orthop*, 96-101. (1993).
- Nelson, C.L., Hickmon, S.G. und Skinner, R.A.: Treatment of experimental osteomyelitis by surgical debridement and the implantation of bioerodable, polyanhydride-gentamicin beads. *J Orthop Res*, **15**: 249-55. (1997).
- Nelson, J.: Acute osteomyelitis in children. *Infect Dis Clin North Am*, **4**: 513-22 (1990).
- Nelson, M., Balasundaram, G. und Webster, T.J.: Increased osteoblast adhesion on nanoparticulate crystalline hydroxyapatite functionalized with KRSR. *Int J Nanomedicine*, **1**: 339-49 (2006).
- Neut, D., van de Belt, H., Stokroos, I., van Horn, J.R., van der Mei, H.C. und Busscher, H.J.: Biomaterial-associated infection of gentamicin-loaded PMMA beads in orthopaedic revision surgery. *J Antimicrob Chemother*, **47**: 885-91. (2001).
- Nicholas, H. und McDonald, L.E.: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics.*, p 834. Iowa, Iowa State University (1988).

- Nicholas, P., Meyers, B.R., Levy, R.N. und Hirschman, S.Z.: Concentration of clindamycin in human bone. *Antimicrob Agents Chemother*, **8**: 220-1. (1975).
- Nie, L., Nicolau, D.P., Tessier, P.R., Kourea, H.P., Browner, B.D. und Nightingale, C.H.: Use of a bioabsorbable polymer for the delivery of ofloxacin during experimental osteomyelitis treatment. *J Orthop Res*, **16**: 76-9. (1998).
- Nishizawa, K., Toriyama, M., Suzuki, T., Kawamoto, Y., Yokugawa, Y. und Nagata, F.: Surface modification of calcium phosphate ceramics with silane coupling agents. *Chem Soc Japan*, **1**: 63-7 (1995).
- Noess, A., Hauge, B. und Solberg, C.O.: Effects of clindamycin and cefuroxime on leukocyte membrane receptors and function. *Chemotherapy*, **35**: 193-9 (1989).
- Norden, C.W.: Diagnosis and treatment of osteomyelitis. *Cutis*, **36**: 13-4. (1985).
- Norden, C.W., Shinnars, E. und Niederriter, K.: Clindamycin treatment of experimental chronic osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*, **153**: 956-9. (1986).
- Nordstrom, E., Ohgushi, H., Yoshikawa, T., Yokobori, A.T., Jr. und Yokobori, T.: Osteogenic differentiation of cultured marrow stromal stem cells on surface of microporous hydroxyapatite based mica composite and macroporous synthetic hydroxyapatite. *Biomed Mater Eng*, **9**: 21-6 (1999).
- Ohgushi, H. und Caplan, A.I.: Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*, **48**: 913-27 (1999).
- Ohgushi, H., Dohi, Y., Tamai, S. und Tabata, S.: Osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells in porous hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res*, **27**: 1401-7. (1993).
- Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Koller, K.P., Hell, W., Wichelhaus, T.A. und Hacker, J.: Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (hla) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**: 2817-23. (1998).
- Ono, I., Inoue, M. und Kuboki, Y.: Promotion of the osteogenetic activity of recombinant human bone morphogenetic protein by prostaglandin E1. *Bone*, **19**: 581-8. (1996).
- Ono, I., Tateshita, T., Takita, H. und Kuboki, Y.: Promotion of the osteogenetic activity of recombinant human bone morphogenetic protein by basic fibroblast growth factor. *J Craniofac Surg*, **7**: 418-25. (1996).
- Oreffo, R.O., Driessens, F.C., Planell, J.A. und Triffitt, J.T.: Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements. *Biomaterials*, **19**: 1845-54. (1998).
- Osborn, J.: Biowerkstoffe und ihre Anwendung bei Implantaten. *Schw. Mschr. Zahnheilkd.*, **89**: 1138-9 (1979).
- Osborn, J.F.: Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik - Grundlagen und klinische Anwendung. *Quintessenz Verlags-GmbH*, (1985).
- Osborn, J.F. und Newesely, H.: The material science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, **1**: 108-11. (1980).



- Otter, M., Goheen, S. und Williams, W.S.: Streaming potentials in chemically modified bone. *J Orthop Res*, **6**: 346-59 (1988).
- Overbeck, J.P., Winckler, S.T., Meffert, R., Tormala, P., Spiegel, H.U. und Brug, E.: Penetration of ciprofloxacin into bone: a new bioabsorbable implant. *J Invest Surg*, **8**: 155-62. (1995).
- Owen, M.: Histogenesis of bone cells. *Calcif Tiss Res*, **25**: 205-7 (1978).
- Palmer, R.J., Jr. und White, D.C.: Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol*, **5**: 435-40. (1997).
- Pankratov, A.S., Zuev, V.P. und Alekseeva, A.N.: [The use of hydroxyapatite with ultrahigh dispersity in the combined treatment of patients with mandibular fractures]. *Stomatologija (Mosk)*, **74**: 22-5 (1995).
- Perry, C.R., Pearson, R.L. und Miller, G.A.: Accuracy of cultures of material from swabbing of the superficial aspect of the wound and needle biopsy in the preoperative assessment of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am*, **73**: 745-9 (1991).
- Peterson, J.P., Ruecker, A., Stechow, v.D., Adamietz, P., Poertner, R., Rueger, J.M. und Meenen, N.M.: Present and Future Therapies of Articular Cartilage Defects. *European Journal of Trauma*, **1**: 1-10 (2003).
- Petruskevicius, J., Kaalund, S., Nielsen, S., Knudsen, P.R. und Overgaard, S.: Moderate effect of osteoset bone graft substitute on bone healing in humans. In: *47th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society*. San Francisco, California (2001).
- Petruskevicius, J., Nielsen, S., Kaalund, S., Knudsen, P.R. und Overgaard, S.: No effect of Osteoset, a bone graft substitute, on bone healing in humans: a prospective randomized double-blind study. *Acta Orthop Scand*, **73**: 575-8. (2002).
- Pharmacia&Upjohn: Clindamycin. (1996).
- Piattelli, M., Favero, G.A., Scarano, A., Orsini, G. und Piattelli, A.: Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **14**: 835-40. (1999).
- Pinholt, E.M., Bang, G. und Haanaes, H.R.: Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *Scand J Dent Res*, **99**: 154-61. (1991).
- Poumarat, G. und Squire, P.: Comparison of mechanical properties of human, bovine bone and a new processed bone xenograft. *Biomaterials*, **14**: 337-40. (1993).
- Primeau, M.N. und Adkinson, N.F., Jr.: Penicillin allergy: clinical quandaries. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **88**: 1-3. (2002).
- Prokesch, R.C. und Hand, W.L.: Antibiotic entry into human polymorphonuclear leukocytes. *Antimicrob Agents Chemother*, **21**: 373-80. (1982).
- Pruss, A., Kao, M., Gohs, U., Koscielny, J., von Versen, R. und Pauli, G.: Effect of gamma irradiation on human cortical bone transplants contaminated with enveloped and non-enveloped viruses. *Biologicals*, **30**: 125-33. (2002).

- Quie, P.G. und Belani, K.K.: Coagulase negative staphylococcal adherence and persistence. *J Infect Dis*, **156**: 543-7 (1987).
- Quteish, D., Singh, G. und Dolby, A.E.: Development and testing of a human collagen graft material. *J Biomed Mater Res*, **24**: 749-60. (1990).
- Radin, S., Ducheyne, P., Berthold, P. und Decker, S.: Effect of serum proteins and osteoblasts on the surface transformation of a calcium phosphate coating: a physicochemical and ultrastructural study. *J Biomed Mater Res*, **39**: 234-43. (1998).
- Rahn, B.A.: Die polychrome Sequenzmarkierung des Knochens. *Nova Acta Leopoldina*, **44**: (1976).
- Rahn, B.A. und Perren, S.M.: Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling. *Experientia*, **28**: 180. (1972).
- Rahn, B.V., Bacellar, F.C., Trapp, L. und Perren, S.M.: A method for morphometry of bone formation using fluorochromes. *Aktuelle Traumatol*, **10**: 109-15. (1980).
- Ramchandani, M. und Robinson, D.: In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50:50 implants. *J Control Release*, **54**: 167-75. (1998).
- Rauschmann, M.A., Wichelhaus, T.A., Stirnal, V., Dingeldein, E., Zichner, L., Schnettler, R. und Alt, V.: Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials*, **26**: 2677-84 (2005).
- Reddi, A.H.: Cell biology and biochemistry of enchondral bone development. *Collagen Res*, **1**: 209-26 (1981).
- Reddi, A.H. und Sullivan, N.E.: Matrix-induced enchondral bone differentiation. Influence of hypophysectomy, growth hormone and thyroid stimulating hormone. *Endocrinology*, **107**: 1291-9 (1980).
- Reddi, A.H., Wientroub, S. und Muthukumaran, N.: Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am*, **18**: 207-12. (1987).
- Redl, H., Schlag, G., Stanek, G., Hirschl, A. und Seelich, T.: In vitro properties of mixtures of fibrin seal and antibiotics. *Biomaterials*, **4**: 29-32. (1983).
- Reinle, T.: *Untersuchungen zur Biokompatibilität eines Antibiotikumträgers aus Kalziumsulfat und nanopartikulärem Hydroxylapatit und zur Pharmakokinetik von Gentamicin, Vancomycin und Clindamycin nach Implantation in Kaninchenfemura*. Justus-Liebig-Universität Giessen, Fachbereich Veterinärmedizin, Giessen. 115 (2005).
- Richard, M., Aguado, E., Cottrel, M. und Daculsi, G.: Ultrastructural and electron diffraction of the bone-ceramic interfacial zone in coral and biphasic CaP implants. *Calcif Tissue Int*, **62**: 437-42. (1998).
- Riegels-Nielsen, P., Espersen, F., Holmich, L.R. und Frimodt-Møller, N.: Collagen with gentamicin for prophylaxis of postoperative infection. Staphylococcus aureus osteomyelitis studied in rabbits. *Acta Orthop Scand*, **66**: 69-72. (1995).
- Riegels-Nielsen, P., Greiff, J. und Lovgreen Nielsen, P.: Spongostan used for space obliteration in bone defects. *Acta Orthop Belg*, **52**: 46-53. (1986).

- Ristuccia, A.M. und Cuhna, B.A.: The aminoglykosides. *Med Clin North Am*, **66**: 303-12 (1982).
- Rittmeister, M., Hochmuth, K., Kriener, S. und Richolt, J.: [Five-Year results following autogenous osteochondral transplantation to the femoral head]. *Orthopäde*, **34**: 322-6 (2005).
- Robinson, D., Alk, D., Sandbank, J., Farber, R. und Halperin, N.: Inflammatory reactions associated with a calcium sulfate bone substitute. *Ann Transplant*, **4**: 91-7 (1999).
- Robinson, R.A. und Watson, M.L.: Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope. *anat rec*, **114**: 383-410 (1952).
- Roesgen, M.: [The regenerative ability of the iliac crest following spongiosa removal in man--induction by phosphate ceramics? I]. *Unfallchirurgie*, **16**: 258-65. (1990).
- Rogers-Foy, J.M., Powers, D.L., Brosnan, D.A., Barefoot, S.F., Friedman, R.J. und LaBerge, M.: Hydroxyapatite composites designed for antibiotic drug delivery and bone reconstruction: a caprine model. *J Invest Surg*, **12**: 263-75. (1999).
- Romano, A., Di Fonso, M., Artesani, M.C., Viola, M., Andriolo, M. und Pettinato, R.: Delayed hypersensitivity to piperacillin. *Allergy*, **57**: 459. (2002).
- Röser, K., Donath, K. und Schnettler, R.: Histopathologische und histochemische Untersuchungen an unentkalkten Schliffpräparaten zur Knochendefektheilung unter Verwendung allogener Transplantate und poröser Hydroxylapatitkeramik-Implantate. *Osteo Int*, **2**: 128-34 (1994).
- Roy, D.M. und Linnehan, S. A.: Hydroxyapatite formed from coral skeleton carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*, **247**: 220-7 (1974).
- Rueger, J.M.: [Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead?]. *Unfallchirurg*, **99**: 228-36. (1996).
- Rueger, J.M.: [Bone substitution materials. Current status and prospects]. *Orthopäde*, **27**: 72-9. (1998).
- Rutherford, R.B., Moalli, M., Franceschi, R.T., Wang, D., Gu, K. und Krebsbach, P.H.: Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone in vivo. *Tissue Eng*, **8**: 441-52. (2002).
- Ryden, C., Yacoub, A.I., Maxe, I., Heinegard, D., Oldberg, A., Franzen, A., Ljungh, A. und Rubin, K.: Specific binding of bone sialoprotein to *Staphylococcus aureus* isolated from patients with osteomyelitis. *Eur J Biochem*, **184**: 331-6. (1989).
- Saito, A., Koga, H. und Shigeno, Y.: Measurement of polymorphonuclear leukocytes penetration of antibiotics by high-performance liquid chromatography and study of intracellular antimicrobial activity of antibiotics. In: *Host Defense and Antibiotics*. Ed by Chemother, I.C. Kyoto, Qie P.G., Hara K. (1985).
- Sajonski, H. und Smollich, A.: *Zelle und Gewebe*, (1990).
- Salvati, E., Callaghan, J., Brause, B. und Klein, R.: Reimplantation in infection: elution of gentamicin from cement and beads. *Clin Orthop*, **207**: 83-93 (1986).
- Santos, J.I., Arbo, A. und Pavia, N.: In vitro and in vivo effects of clindamycin on polymorphonuclear leukocyte function. *Clin Ther*, **14**: 578-94. (1992).

- Sarkar, M.R., Wachter, N., Patka, P. und Kinzl, L.: First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone. *J Biomed Mater Res*, **58**: 329-34. (2001).
- Sasaki, S. und Ishii, Y.: Apatite cement containing antibiotics: efficacy in treating experimental osteomyelitis. *J Orthop Sci*, **4**: 361-9 (1999).
- Sasaki, T. und Watanabe, C.: Stimulation of osteoinduction in bone wound healing by high-molecular hyaluronic acid. *Bone*, **16**: 9-15. (1995).
- Scevola, D., Concia, E., Tinelli, M., Benzi, R., Monzillo, V. und Cremonesi, G.: Chemiluminescence, phagocytosis, chemotaxis and killing activity of human leukocytes exposed to Clindamycin. *Microbiologica*, **9**: 209-14. (1986).
- Schaberg, D.R., Clewell, D.B. und Glatzer, L.: Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **22**: 204-7. (1982).
- Schlegel, A.K.: [Bio-Oss--bone replacement material. Long-term results with Bio-Oss bone replacement material]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, **106**: 141-9 (1996).
- Schlegel, A.K. und Donath, K.: BIO-OSS--a resorbable bone substitute? *J Long Term Eff Med Implants*, **8**: 201-9 (1998).
- Schmid, C., Keller, C., Schlapfer, I., Veldman, C. und Zapf, J.: Calcium and insulin-like growth factor I stimulation of sodium- dependent phosphate transport and proliferation of cultured rat osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**: 220-5. (1998).
- Schmidt, C., Wenz, R., Nies, B. und Moll, F.: Antibiotic in vivo / in vitro release, histocompatibility and biodegradation of gentamicin implants based on lactic acid polymers and copolymers. *J Controlled Release*, **37**: 83-94 (1995).
- Schneider, P. und Visconti, J.A.: Pharmacokinetics in drug therapy III: Clindamycin dosage regimens for treatment of chronic osteomyelitis. *Am J Hosp Pharm*, **34**: 980-3. (1977).
- Schnettler, R.: Experimentelle Untersuchungen zum Einwachsverhalten von autogenen und allogenen Spongiosatransplantaten im Vergleich zu Keramik, DBM und basischem Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF). *Med. Habilitationsschrift*, (1992).
- Schnettler, R., Dingeldein, E., Tausch, W. und Ritter, B.: Untersuchung zur knöchernen Integration einer Hydroxylapatit-Keramik (Endobon) und "Fibroblast Growth Factor" im Vergleich zu autogenen Sponiosazylindern. *Osteo Int*, **2**: 118-26 (1994).
- Schurman, D.J., Johnson, B.L., Jr., Finerman, G. und Amstutz, H.C.: Antibiotic bone penetration. Concentrations of methicillin and clindamycin phosphate in human bone taken during total hip replacement. *Clin Orthop*, 142-6. (1975).
- Schwank, S., Rajacic, Z., Zimmerli, W. und Blaser, J.: Impact of bacterial biofilm formation on in vitro and in vivo activities of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**: 895-8. (1998).
- Schwarz, F., Bieling, K., Latz, T., Nuesry, E. und Becker, J.: Healing of intrabony peri-implantitis defects following application of a nanocrystalline hydroxyapatite

- (Ostim) or a bovine-derived xenograft (Bio-Oss) in combination with a collagen membrane (Bio-Gide). A case series. *J Clin Periodontol.*, **33**: 491-9 (2006).
- Schwarz, F., Sculean, A., Bieling, K., Ferrari, D., Rothamel, D. und Becker, J.: Two-year clinical results following treatment of peri-implantitis lesions using a nanocrystalline hydroxyapatite or a natural bone mineral in combination with a collagen membrane. *J Clin Periodontol*, **35**: 80-7 (2008).
- Schweiberer, L., Hallfeldt, K. und Mandelkow, H.: [Osteoid induction]. *Orthopäde*, **15**: 3-9. (1986).
- Seber, S., Gunal, I. und Gokturk, E.: Antibiotic-impregnated xenografts in the treatment of chronic osteomyelitic cavities. Seven cases followed for 3 to 5 years. *Int Orthop*, **22**: 197-9 (1998).
- Selan, L., Thaller, M.C., Berlutti, F., Passariello, C., Scazzocchio, F. und Renzini, G.: Effect of slime production on the antibiotic susceptibility of isolates from prosthetic infections. *J Chemother*, **1**: 369-73. (1989).
- Semel, J.D., Trenholme, G.M. und Levin, S.: Gentamicin- and clindamycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Med Sci*, **280**: 4-9. (1980).
- Sethuraman, S., Nair, L.S., El-Amin, S., Nguyen, M.T., Greish, Y.E., Bender, J.D., Brown, P.W., Allcock, H.R. und Laurencin, C.T.: Novel low temperatur setting nanocrystalline calcium phosphate cements for bone repair: osteoblast cellualr response and gene expression studies. *J Biomed Mater Res A*, **82**: 884-91 (2007).
- Shibl, A.M.: Role of *Staphylococcus aureus* exfoliatin toxin in staphylococcal infections in mice. *Chemotherapy*, **27**: 224-7 (1981).
- Shirliff, M.E., Calhoun, J.H. und Mader, J.T.: Experimental osteomyelitis treatment with antibiotic-impregnated hydroxyapatite. *Clin Orthop*, 239-47. (2002).
- Siebert, H.R., Wagner, K. und Rueger, J.M.: [Biological value of various bone substitutes in the treatment of bone defects. Animal experiment studies]. *Unfallchirurgie*, **12**: 98-100. (1986).
- Skinner, H.B.: Alternatives in the selection of allograft bone. *Orthopedics*, **13**: 843-6. (1990).
- Skoglund, A., Hising, P. und Young, C.: A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **12**: 194-9. (1997).
- Skoutelis, A.T., Lianou, P.E. und Bassaris, H.P.: In vivo potentiation of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by clindamycin. *Infection*, **21**: 321-3. (1993).
- Smeets, R., Grosjean, M.B., Jelitte, G., Heiland, M., Kasaj, A., Riediger, D., Yildirim, M., Spiekermann, H. und Maciejewski, O.: [Hydroxyapatite bone substitute (Ostim) in sinus floor elevation. Maxillary sinus floor augementation: bone regeneration by means of a nanocrystalline in-phase hydroxyapatite (Ostim)]. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, **118**: 203-12 (2008).
- Smith, S.M., Mangia, A., Eng, R.H., Ruggeri, P., Cytryn, A. und Tecson-Tumang, F.: Clindamycin for colonization and infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection*, **16**: 95-7. (1988).

- Soldner, E.: Knorpel-Knochen-Transplantation. *Trauma und Berufskrankheit*, **1**: 83-226 (1999).
- Sorensen, T.S., Sorensen, A.I. und Merse, S.: Rapid release of gentamicin from collagen sponge. In vitro comparison with plastic beads. *Acta Orthop Scand*, **61**: 353-6. (1990).
- Soshi, S., Takahashi, H.E., Tanizawa, T., Endo, N., Fujimoto, R. und Murota, K.: Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rh G-CSF) on rat bone: inhibition of bone formation at the endosteal surface of vertebra and tibia. *Calcif Tissue Int*, **58**: 337-40. (1996).
- Souli, M. und Giamarellou, H.: Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**: 939-41. (1998).
- Spangler, S.K., Jacobs, M.R. und Appelbaum, P.C.: Bactericidal activity of DU-6859a compared to activities of three quinolones, three beta-lactams, clindamycin, and metronidazole against anaerobes as determined by time-kill methodology. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**: 847-9. (1997).
- Spies, C., Schnürer, S., Gotterbarm, T. und Breusch, S.: [Animal study of the bone substitute material Ostim within osseous defects in Göttinger minipigs]. *Z Orthop Unfall*, **146**: 64-9 (2008).
- Springfield, D.S.: Massive autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am*, **18**: 249-56. (1987).
- Staniszewska-Kus, J.: [Biological testing of hemostatic properties of various collagen preparations]. *Polim Med*, **15**: 21-34 (1985).
- Stemberger, A., Grimm, H., Bader, F., Rahn, H.D. und Ascherl, R.: Local treatment of bone and soft tissue infections with the collagen-gentamicin sponge. *Eur J Surg Suppl*, **578**: 17-26 (1997).
- Stevens, D.L., Maier, K.A. und Mitten, J.E.: Effect of antibiotics on toxin production and viability of *Clostridium perfringens*. *Antimicrob Agents Chemother*, **31**: 213-8. (1987).
- Stevenson, S.: The immune response to osteochondral allografts in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, **69**: 573-82 (1987).
- Stevenson, S., Shaffer, J. und Goldberg, V.: The humoral response to vascular and nonvascular allografts of bone. *Con Orthop Relat Res*, **326**: 86-95 (1996).
- Stewart, P.S. und Costerton, J.W.: Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, **358**: 135-8. (2001).
- Strauß, A.: *Lokaler Antibiotikumträger aus Kalziumsulfat. Verträglichkeit im Gewebe und Pharmakokinetik der angewendeten Antibiotika nach Implantation in Kaninchen*. Justus-Liebig-Universität Giessen, Dissertationsschrift, Fachbereich Veterinärmedizin, Giessen. (1999).
- Strietzel, F.P., Reichart, P.A. und Graf, H.L.: Lateral alveolar ridge augmentation using nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim): preliminary clinical and histological results. *Clin Oral Implants Res*, **18**: 743-51 (2007).

- Strietzel, F.P., Reichart, P.A. und Graf, H.L.: Lateral alveolar ridge augmentation using a synthetic nano-crystalline hydroxyapatite bone substitution material (Ostim): preliminary clinical and histological results. *Clin Oral Implants Res.*, **18**: 743-51 (2007).
- Stringa, E., Filanti, C., Giunciuglio, D., Albini, A. und Manduca, P.: Osteoblastic cells from rat long bone. I. Characterization of their differentiation in culture. *Bone*, **16**: 663-70. (1995).
- Stürmer, K.M., Schütte, D., Hirche, H. und al., e.: Mikrobiologische und histologische Untersuchungen über die Anreicherung des Antibiotikums Clindamycin im gesunden, infizierten und sequestrierten Knochen bei 41 Patienten. *Unfallheilkunde*, **84**: (1981).
- Stutzle, H., Hallfeldt, K., Mandelkow, H., Kessler, S. und Schweiberer, L.: [Bone regeneration stimulated by bone substitute materials]. *Orthopäde*, **27**: 118-25. (1998).
- Stutzle, H., Kessler, S., Mandelkow, H. und Schweiberer, L.: [Organization of a bone bank]. *Unfallchirurg*, **94**: 619-23. (1991).
- Summersgill, J.T., Schupp, L.G. und Raff, M.J.: Comparative penetration of metronidazole, clindamycin, chloramphenicol, cefoxitin, ticarcillin, and moxalactam into bone. *Antimicrob Agents Chemother*, **21**: 601-3. (1982).
- Sun, L., Hu, Y., Ning, Z. und Liang, Z.: The correlation between immune rejection and osteoinduction of allogeneic bone grafting. *Chin Med J (Engl)*, **111**: 818-22. (1998).
- Tally, F.P., Snyderman, D.R., Gorbach, S.L. und Malamy, M.H.: Plasmid-mediated, transferable resistance to clindamycin and erythromycin in *Bacteroides fragilis*. *J Infect Dis*, **139**: 83-8. (1979).
- Tamai, N., Myoui, A., Tomita, T., Nakase, T., Tanaka, J., Ochi, T. und Yoshikawa, H.: Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res*, **59**: 110-7. (2002).
- Tani-Ishii, N., Wang, C.Y. und Stashenko, P.: Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*, **10**: 213-9. (1995).
- Tas, A.C.: Synthesis of biomimetic ca-hydroxyapatite powders at 37 degrees C in synthetic body fluids. *Biomaterials*, **21**: 1429-38 (2000).
- Taylor, J.C., Cuff, S.E., Leger, J.P., Morra, A. und Anderson, G.I.: In vitro osteoclast resorption of bone substitute biomaterials used for implant site augmentation: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **17**: 321-30. (2002).
- Tedesco, F.J., Barton, R.W. und Alpers, D.H.: Clindamycin-associated colitis. A prospective study. *Ann Intern Med*, **81**: 429-33. (1974).
- Tetzloff, T.R., McCracken, G.H. und Nelson, F.F.: Oral antibiotic therapy for skeletal infections in children. II. Therapy of osteomyelitis and suppurative arthritis. *J Pediatr*, **92**: 485-90 (1978).
- Thorwarth, M., Schultze-Mosgau, S., Kessler, P., Wiltfang, J. und Schlegel, K.A.: Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **63**: 1626-33 (2005).

- Tomford, W.W. und Mankin, H.J.: Bone banking. Update on methods and materials. *Orthop Clin North Am*, **30**: 565-70. (1999).
- Tomford, W.W., Starkweather, R.J. und Goldman, M.H.: A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. *J Bone Joint Surg Am*, **63**: 244-8. (1981).
- Tracy, B.M. und Doremus, R.H.: Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxylapatite interface. *J Biomed Mater Res*, **18**: 719-26 (1984).
- Traub, W.H.: Comparative in vitro bactericidal activity of 24 antimicrobial drugs against *Clostridium perfringens*. *Chemotherapy*, **36**: 127-35 (1990).
- Tsourvakas, S., Hatzigrigoris, P., Tsibinos, A., Kanellakopoulou, K., Giamarellou, H. und Dounis, E.: Pharmacokinetic study of fibrin clot-ciprofloxacin complex: an in vitro and in vivo experimental investigation. *Arch Orthop Trauma Surg*, **114**: 295-7 (1995).
- Turner, T.M., Urban, R.M., Gitelis, S., Kuo, K.N. und Andersson, G.B.: Radiographic and histologic assessment of calcium sulfate in experimental animal models and clinical use as a resorbable bone-graft substitute, a bone-graft expander, and a method for local antibiotic delivery. One institution's experience. *J Bone Joint Surg Am*, **83-A**: 8-18. (2001).
- Uchida, A.-., Lade, S.M.L., McCartney, E.R. und Ching, W.: The use of ceramics for bone replacement. *J Bone Joint Surg*, **66-B**: 269-75 (1984).
- Umemura, M., Kawai, T., Mieki, A., Kataoka, H., Kurita, S., Koie, M., Kishi, M., Ohno, Y., Hasegawa, J. und et al.: [Bone inductive activity of hydroxyapatite-bone morphogenetic protein complex]. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*, **31**: 860-9. (1989).
- Urist, M.R., DeLange, R.J. und Finerman, G.A.: Bone cell differentiation and growth factors. *Science*, **220**: 680-6. (1983).
- Urist, M.R., Hay, P.H., Dubuc, F. und Buring, K.: Osteogenetic competence. *Clin Orthop*, **64**: 194-220. (1969).
- Urist, M.R., Lietze, A., Mizutani, H., Takagi, K., Triffitt, J.T., Amstutz, J., DeLange, R., Termine, J. und Finerman, G.A.: A bovine low molecular weight bone morphogenetic protein (BMP) fraction. *Clin Orthop*, 219-32. (1982).
- Urist, M.R., Mikulski, A.J., Nakagawa, M. und Yen, K.: A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. *Am J Physiol*, **232**: C115-27. (1977).
- Urist, M.R., Sato, K., Brownell, A.G., Malinin, T.I., Lietze, A., Huo, Y.K., Prolo, D.J., Oklund, S., Finerman, G.A. und DeLange, R.J.: Human bone morphogenetic protein (hBMP). *Proc Soc Exp Biol Med*, **173**: 194-9. (1983).
- Valentini, P. und Abensur, D.: Maxillary sinus floor elevation for implant placement with demineralized freeze-dried bone and bovine bone (Bio-Oss): a clinical study of 20 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*, **17**: 232-41. (1997).
- Valentini, P., Abensur, D., Wenz, B., Peetz, M. und Schenk, R.: Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*, **20**: 245-53. (2000).



- van de Belt, H., Neut, D., Schenk, W., van Horn, J.R., van der Mei, H.C. und Busscher, H.J.: Gentamicin release from polymethylmethacrylate bone cements and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Acta Orthop Scand*, **71**: 625-9. (2000).
- van de Belt, H., Neut, D., Uges, D.R., Schenk, W., van Horn, J.R., van der Mei, H.C. und Busscher, H.J.: Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release. *Biomaterials*, **21**: 1981-7. (2000).
- van Langevelde, P., van Dissel, J.T., Meurs, C.J., Renz, J. und Groeneveld, P.H.: Combination of flucloxacillin and gentamicin inhibits toxic shock syndrome toxin 1 production by *Staphylococcus aureus* in both logarithmic and stationary phases of growth. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**: 1682-5. (1997).
- Vecsei, V. und Barquet, A.: Treatment of chronic osteomyelitis by necrectomy and gentamicin-PMMA beads. *Clin Orthop*, 201-7. (1981).
- Veen MR, B.R., Petit P: Bacteriology in bone banking. In: *1st European Conference on Tissue Banking and Clinical Application*, p 20. (1991).
- Veringa, E.M., Ferguson, D.A., Jr., Lambe, D.W., Jr. und Verhoef, J.: The role of glycocalyx in surface phagocytosis of *Bacteroides* spp., in the presence and absence of clindamycin. *J Antimicrob Chemother*, **23**: 711-20. (1989).
- Vilain, J. und Courtmans, I.: What future in the 21st century for tibial bone allografts in ossicular chain reconstruction: the state of the issue. *Acta Otorhinolaryngol Belg*, **54**: 443-50 (2000).
- Virolainen, P., Perala, M., Vuorio, E. und Aro, H.T.: Expression of matrix genes during incorporation of cancellous bone allografts and autografts. *Clin Orthop*, 263-72. (1995).
- Vitalli, H.P.: Die biologischen Grundlagen der Knochentransplantation. *Z. Orthop.*, **99**: 146-66 (1965).
- Vitalli, H.P.: Knochenerkrankungen - Histologie und Klinik. Hrsg. Sandoz, (1970).
- von Eiff, C., Bettin, D., Proctor, R.A., Rolaufts, B., Lindner, N., Winkelmann, W. und Peters, G.: Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. *Clin Infect Dis*, **25**: 1250-1. (1997).
- von Hasselbach, C.: [Clinical aspects and pharmacokinetics of collagen-gentamycin as adjuvant local therapy of osseous infections]. *Unfallchirurg*, **92**: 459-70. (1989).
- Vuola, J., Bohling, T., Kinnunen, J., Hirvensalo, E. und Asko-Seljavaara, S.: Natural coral as bone-defect-filling material. *J Biomed Mater Res*, **51**: 117-22. (2000).
- Wachol-Drewek, Z., Pfeiffer, M. und Scholl, E.: Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. *Biomaterials*, **17**: 1733-8. (1996).
- Wahlig, H.: Gentamicin-PMMA beads, a drug delivery system; basic results. *Departement of medical microbiology, medical research, E. Merck, Darmstadt, F. R. G.*, 917 (1980).

- Wahlig, H.: Gentamicin-PMMA beads: a drug delivery system in the treatment of chronic bone and soft tissue infections. *J Antimicrob Chemother*, **10**: 463-5. (1982).
- Wahlig, H. und Dingeldein, E.: [Antibiotics and bone cements. Experimental and clinical long-term observations]. *Acta Orthop Scand*, **51**: 49-56. (1980).
- Wahlig, H. und Dingeldein, E.: Biomaterialien als Wirkstoffträger für die lokale Anwendung in Chirurgie und Orthopädie. *Primär- und Revisionsalloarthroplastik*, Hrsg.: Endo-Klinik, Hamburg, Springer Verlag Berlin, 357-67 (1987).
- Wahlig, H. und Dingeldein, E.: [Collagen-fleece for local treatment of infections, loaded with a new gentamicin salt of low water solubility]. *The third World biomaterials Congress - Kyoto, Japan*, (1988).
- Wahlig, H., Dingeldein, E., Bergmann, R. und Reuss, K.: The release of gentamicin from polymethylmethacrylate beads. An experimental and pharmacokinetic study. *J Bone Joint Surg Br*, **60-B**: 270-5. (1978a).
- Wahlig, H., Dingeldein, E., Bergmann, R. und Reuss, K.: [The release of gentamicin from polymethylmethacrylate beads. An experimental and pharmacokinetic study]. *J Bone Joint Surg Br*, **60-B**: 270-5. (1978b).
- Wahlig, H., Dingeldein, E., Bergmann, R. und Reuss, K.: [Experimental and pharmacokinetic studies with gentamicin PMMA beads (author's transl)]. *Zentralbl Chir*, **104**: 923-33 (1979).
- Wahlig, H., Dingeldein, E. und Draenert, K.: Comparison of four different hydroxyapatite ceramics by histomorphological evaluation using a standardized animal model. *Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies of USA, Japan and Canada; Banff, Alberta*, (1991).
- Waldvogel, F.A.: Lincomycin bei reduzierter körpereigener Abwehr. *Symposium: Einsatzmöglichkeiten der Lincomycin-Antibiotika - Berlin*, (1985).
- Waldvogel, F.A., Medoff, G. und Swartz, M.N.: Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. *N Engl J Med*, **282**: 198-206. (1970a).
- Waldvogel, F.A., Medoff, G. und Swartz, M.N.: Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects (second of three parts). *N Engl J Med*, **282**: 260-6. (1970b).
- Waldvogel, F.A., Medoff, G. und Swartz, M.N.: Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. 3. Osteomyelitis associated with vascular insufficiency. *N Engl J Med*, **282**: 316-22. (1970c).
- Waldvogel, F.A., Medoff, G. und Swartz, M.N.: Treatment of osteomyelitis. *N Engl J Med*, **283**: 822. (1970d).
- Walenkamp, G.H.: Gentamicin-PMMA beads: a clinical, pharmacokinetic and topological study. *e. Merck, Darmstadt*, (1983).
- Walenkamp, G.H.: Small PMMA beads improve gentamicin release. *Acta Orthop Scand*, **60**: 668-9. (1989).

- Walenkamp, G.H., Kleijn, L.L. und de Leeuw, M.: Osteomyelitis treated with gentamicin-PMMA beads: 100 patients followed for 1-12 years. *Acta Orthop Scand*, **69**: 518-22. (1998).
- Walenkamp, G.H. und van Rens, T.J.: [Chains of gentamicin-PMMA beads: a new method for the local treatment of osteomyelitis]. *Ned Tijdschr Geneeskd*, **126**: 2136-42. (1982).
- Walenkamp, G.H. und Vree, T.B.: Treatment of a patient with impaired renal function with gentamicin-PMMA-beads. *Arch Orthop Trauma Surg*, **99**: 137-41 (1981).
- Walenkamp, G.H., Vree, T.B. und van Rens, T.J.: Gentamicin-PMMA beads. Pharmacokinetic and nephrotoxicological study. *Clin Orthop*, 171-83. (1986).
- Walenkamp, G.H., Vree, T.B. und Van Rens, T.J.G.: Gentamicin-PMMA beads. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **205**: 171-83 (1981).
- Wang, D., Fei, W. und Liu, S.: [Experimental study of artificial bone composite with high biological induction in repairing bone defect]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, **15**: 3-6. (1997).
- Wang, E.A., Rosen, V., D'Alessandro, J.S., Bauduy, M., Cordes, P., Harada, T., Israel, D.I., Hewick, R.M., Kerns, K.M., LaPan, P. und et al.: Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**: 2220-4. (1990).
- Wang, X., Li, Y., Wei, J. und De Groot, K.: Developement of biomimetic nano-hydroxyapatite/poly(hexamethylene adipamide) composites. *Biomaterials*, **23**: 4787-91 (2002).
- Wang, Y.S., Hou, C.L. und Chen, A.M.: [Experimental study on the hemostatic properties of collagen sponge]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, **15**: 140-3. (2001).
- Wei, G., Kotoura, Y., Oka, M., Yamamuro, T., Wada, R., Hyon, S.H. und Ikada, Y.: A bioabsorbable delivery system for antibiotic treatment of osteomyelitis. The use of lactic acid oligomer as a carrier. *J Bone Joint Surg Br*, **73**: 246-52. (1991).
- Wei, G. und Ma, P.X.: Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **25**: 4749-57 (2004).
- Wei, G. und Ma, P.X.: Macroporous and nanobibrous polymer scaffolds and polymer/bone-like apatite composite scaffolds generated by sugar spheres. *J Biomed Mater Res A*, **78**: 306-315 (2006).
- Wei, S., Li, Y., Zheng, Q., Wei, J., Zhou, L. und Zuo, Y.: [Study on injectable bioactive bone repairing material of nano-hydroxyapatite and polyamide-66 composite.]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, **20**: 590-3 (2003).
- Weiland, A.J., Moore, J.R. und Daniel, R.K.: The efficacy of free tissue transfer in the treatment of osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am*, **66**: 183-93 (1984).
- Weiland, A.J., Phillips, T.W. und Randolph, M.A.: Bone grafts: a radiologic, histologic, and biomechanical model comparing autografts, allografts, and free vascularized bone grafts. *Plast Reconstr Surg*, **74**: 368-79. (1984).

- Weis, E. und Jansen, B.: Teicoplanin-loaded PMMA beads for the treatment of soft tissue and osseous infections. *J Hosp Infect*, **27**: 322-4. (1994).
- Wenz, B., Oesch, B. und Horst, M.: Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*, **22**: 1599-606. (2001).
- Werber, K.D., Brauer, R.B., Weiss, W. und Becker, K.: Osseous integration of bovine hydroxyapatite ceramic in metaphyseal bone defects of the distal radius. *J Hand Surg [Am]*, **25**: 833-41. (2000).
- Wernet, E., Ekkernkamp, A., Jellestad, H. und Muhr, G.: [Antibiotic-containing collagen sponge in therapy of osteitis]. *Unfallchirurg*, **95**: 259-64. (1992).
- Wheat, L.J., Allen, S.D., Henry, M. und al., e.: Diabetic foot infections - bacteriologic analysis. *Arch Intern Med*, **146**: 1935-40 (1986).
- Winkler, H., Janata, O., Berger, C., Wein, W. und Georgopoulos, A.: In vitro release of vancomycin and tobramycin from impregnated human and bovine bone grafts. *J Antimicrob Chemother*, **46**: 423-8. (2000).
- Wozney, J.M., Rosen, V., Byrne, M., Celeste, A.J., Moutsatsos, I. und Wang, E.A.: Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl*, **13**: 149-56 (1990).
- Wright, T.M. und Goodman, S.B.: Implant Wear: The future of total joint replacement. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, (1996).
- Xu, J., Liang, H. und Wang, T.: [Early observation of healing of rabbit mandibular defects with porous blocks consisting of polylactic acid and recombinant human bone morphogenetic protein-2]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, **15**: 200-2. (1997).
- Xue, I.B., Davey, P.G. und Phillips, G.: Variation in postantibiotic effect of clindamycin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and implications for dosing of patients with osteomyelitis. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**: 1403-7. (1996).
- Yagmurcu, M.F., Korkusuz, F., Gursel, I., Korkusuz, P., Ors, U. und Hasirci, V.: Sulbactam-cefoperazone polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate (PHBV) local antibiotic delivery system: in vivo effectiveness and biocompatibility in the treatment of implant-related experimental osteomyelitis. *J Biomed Mater Res*, **46**: 494-503. (1999).
- Yamada, S., Heymann, D., Bouler, J.M. und Daculsi, G.: Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials*, **18**: 1037-41. (1997).
- Yamazaki, Y.: Experimental Study on porous apatite as artificial bone - Experiment on implantation in the mandible. *The J Jpn Oral Pathol*, **51**: 184-218 (1984).
- Yancey, R.J., Sanchez, M.S. und Ford, C.W.: Activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus* within polymorphonuclear neutrophils. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **10**: 107-13. (1991).
- Yesinowski, J.P. und Eckert, H.: Hydrogen environments in calcium phosphates: <sup>1</sup>H MAS NMR at high spinning speeds. *J Am Chem Soc*, **109**: 6274-82 (1987).

- Young, C., Sandstedt, P. und Skoglund, A.: A comparative study of anorganic xenogenic bone and autogenous bone implants for bone regeneration in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **14**: 72-6. (1999).
- Yu, D., Wong, J., Matsuda, Y., Fox, J.L., Higuchi, W.I. und Otsuka, M.: Self-setting hydroxyapatite cement: a novel skeletal drug-delivery system for antibiotics. *J Pharm Sci*, **81**: 529-31. (1992).
- Yu, P., Vlahos, A.L., Dombi, G.W., Ledgerwood, A.M. und Lucas, C.E.: Inhibition of alpha-smooth muscle actin expression in an in vitro wound healing model by certain antibiotics. *J Trauma*, **47**: 130-5. (1999).
- Yuan, H., Kurashina, K., de Bruijn, J.D., Li, Y., de Groot, K. und Zhang, X.: A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, **20**: 1799-806. (1999).
- Yuasa, T., Miyamoto, Y., Ishikawa, K., Takechi, M., Nagayama, M. und Suzuki, K.: In vitro resorption of three apatite cements with osteoclasts. *J Biomed Mater Res*, **54**: 344-50. (2001).
- Yubao, L., Klein, C.P., Zhang, X. und de Groot, K.: Formation of a bone apatite-like layer on the surface of porous hydroxyapatite ceramics. *Biomaterials*, **15**: 835-41. (1994).
- Yubao, L., Klein, C.P.A.T., De Wijn, J., Van de Meer, S. und de Groot, K.: Shape change and phase transition of needle-like non-stoichiometric apatite crystals. *Journal of Materials Science*, 263-68 (1994).
- Zhao, Y.F., Mendes, M., Symington, J.M., Listrom, R.D. und Pritzker, K.P.: Experimental study of bone growth around a dental implant after Surgibone grafting. *Int J Oral Maxillofac Implants*, **14**: 889-97. (1999).
- Zheng, Q., Zhou, L., Wei, S., Li, Y. und Wei, J.: [Experimental study on the reconstruction of mandibular defects with a new bioactive artificial bone nano-hydroxyapatite/polyamide-66 in dogs.]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, **39**: 60-2 (2004).
- Zilch, H. und Lambiris, E.: The sustained release of cefotaxim from a fibrin-cefotaxim compound in treatment of osteitis. Pharmacokinetic study and clinical results. *Arch Orthop Trauma Surg*, **106**: 36-41 (1986).
- Zitzmann, N.U., Scharer, P., Marinello, C.P., Schupbach, P. und Berglundh, T.: Alveolar ridge augmentation with Bio-Oss: a histologic study in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*, **21**: 288-95. (2001).
- Zou, Q., Li, Y., Zhang, L., Zuo, Y. und Li, J.: Antibiotic delivery system using nano-hydroxyapatite/chitosan bone cement consisting of berberine. *J Biomed Mater Res A*, **89**: 1108-17 (2009).
- Zuev, V.P., Dmitrieva, L.A., Pankratov, A.S. und Filatova, N.A.: [The comparative characteristics of stimulators of reparative osteogenesis in the treatment of periodontal diseases]. *Stomatologija*, **75**: 31-4 (1996).

## IX. ANHANG

### IX.1. Postoperative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

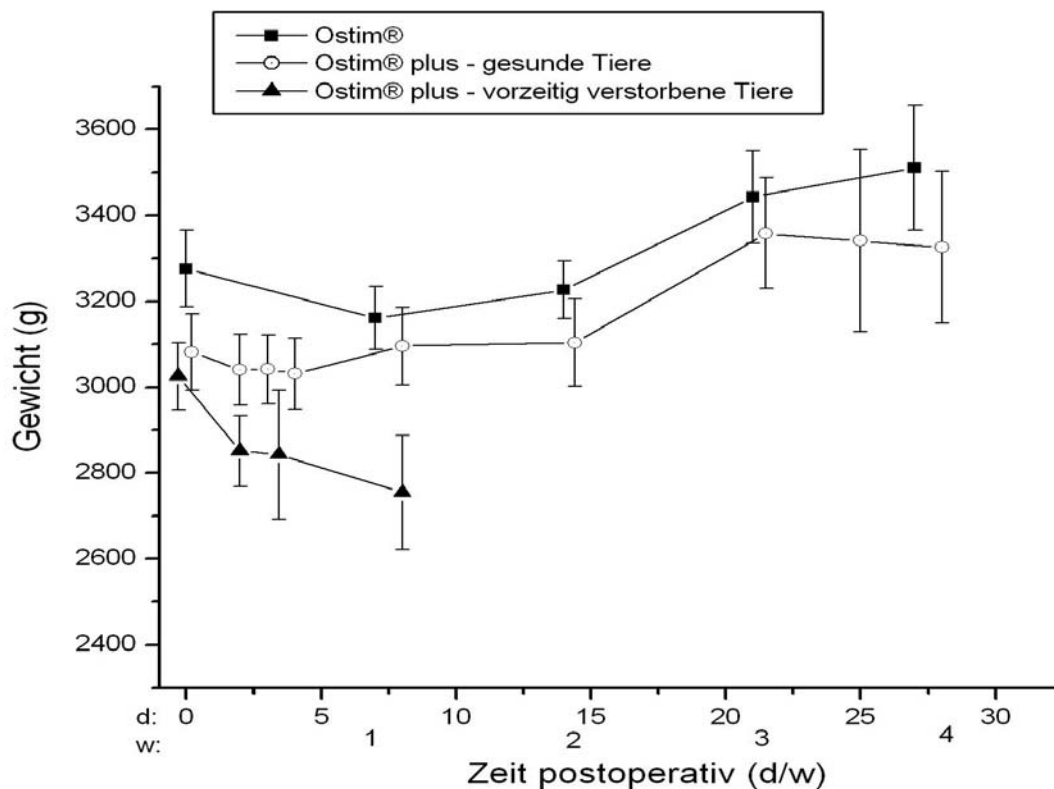


Abbildung 115: Postoperative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere nach Implantation von ca. 1 g Ostim®/Ostim® plus. Arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler. Das durchschnittliche Gewicht der Ostim®-Gruppe unterscheidet sich am siebten postoperativen Tag von dem der vorzeitig verstorbenen Tiere der Ostim® plus-Gruppen vom achten postoperativen Tag ( $p=0,03695$ ). Im Übrigen finden sich keine Hinweise auf Unterschiede zwischen den Gruppen in der paarweisen Testung mittels t-Test.

## **IX.2. Lokale Clindamycinkonzentrationen**

Tabelle 10: Lokale Clindamycinkonzentrationen nach Implantation von ca. 1 g Ostim® plus 10/20 in den Femurmarkraum von 18 Kaninchen. Einzelwerte.

Implantations- dauer (Tage)	Clindamycinaktivität des Implantates					
	10%	20%	10%	20%	10%	20%
	Clindamycinkonzentration (µg/g)					
	Kortikalis		Knochenmark		Implantat	
2 d	1432,6	10504,8	1124,8	85072	10947,6	59424
	1178,2	90,2	50,5	1636	2789,2	1463,2
	282,8	1726,7	27,3	x	1211,8	11984,8
8 d	833,2	2718,8	3598,4	942,4	3123	19155,2
14 d	218,8	842,6	603,7	534	1544,3	4560
	124,2	x	81,6	1,3	1294	10,7
	38,1		9,1		246	
28 d	x	x	x	x	8,6	x
	x	x	x	x	3	x
	x		x		x	

x: unter der Nachweisgrenze (0,2 µg/g)

## **IX.3. Postoperative Clindamycinserumkonzentrationen**

Tabelle 11: Postoperative Clindamycinserumspiegel nach Implantation von ca. 1 g Ostim® plus 10/20 in den Femurmarkraum von 18 Kaninchen. Geometrische Mittelwerte (µg/ml) mit 2s-Intervall ([ ]).

Stunden postoperativ	Postoperative Clindamycinserumspiegel Geometrische Mittelwerte (µg/ml) mit 2s-Intervall ([ ])	
	Ostim® plus 10	Ostim® plus 20
2	0,943 [0,319; 2,790]	1,062 [0,371; 3,039]
4	1,036 [0,317; 3,389]	1,094 [0,369; 3,239]
8	0,887 [0,238; 3,306]	1,098 [0,348; 3,465]
24	0,685 [0,159; 2,946]	0,829 [0,329; 2,092]
48	0,319 [0,046; 2,232]	0,279 [0,061; 1,266]
72	0,316 [0,081; 1,160]	0,355 [0,046; 2,762]

## **IX.4. Rezepturen und Arbeitsabläufe**

### **IX.4.1. Karnovskylösung**

40 g	Paraformaldehyd
1,2 ml	1 N NaOH
100 ml	Glutardialdehyd 50%-ig
1000 ml	Phosphatpuffer nach Sørensen
500 ml	VE-Wasser
pH-Wert	7,2-7,4

### **IX.4.2. Phosphatpufferlösungen**

#### ***Phosphatpufferstammlösung 1-molar***

Vermengung von 112,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 30 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1000 ml VE-Wasser

#### ***Phosphatpuffer 1/15-molar***

23,97 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 44,35 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 2500 ml VE-Wasser auflösen

### **IX.4.3. Toluidinblaufärbung**

1. Präparatschliff 10 Minuten in 30%-igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Rühren anätzen
2. Abspülen mit Leitungswasser und Abwischen mit Zellstoff
3. 5 - 15 Minuten mit Toluidinblaulösung färben
4. Abspülen mit Leitungswasser und Abwischen mit Zellstoff
5. Eindecken mit lichthärtendem Einkomponentenpräzisionskleber (Technovit 7210 VLC; Kulzer & Co GmbH) und Deckgläschen



**IX.5. Pathologischer Befundbericht****Befundbericht****fzmb-**  
**diagnostik**

An Einsender
Coripharm
Karl Hubenschmid
Industrieforschungsauftrag Clindamycin-Hydroxylapatit (Tierversuch mit Kaninchen)

Forschungszentrum für Medizintechnik und  
Biotechnologie e. V. - fzmb-diagnostik  
Geranienweg 7  
99947 Bad Langensalza  
Tel.: 03 603 - 833 170 (Labor)  
Fax: - 833 150

Tierhalter	Patient
Coripharm/fzmb	Kaninchenbestand

Rechnungsbetrag - netto	
DM an Tierarzt	237,00 DM an Tierhalter zuzüglich Verwaltungsaufwand und MwSt.

**1. Angaben zur Einsendung und zur Untersuchung**

Labornummer 1061 u. 1062	Probenart 2 Tierkörper	Datum Probeneingang 08.06.2000	Datum Befundausgang 16.06.00
-----------------------------	---------------------------	-----------------------------------	---------------------------------

Todeszeitpunkt: in der Nacht zum 08.06.2000

Untersuchungsgut: 2 verendete Kaninchen

Signalement: Weiße Neuseeländer, 1 Jahr, weiblich

Vorbericht: postoperative Komplikationen (intramedulläre Clindamycin-Hydroxylapatit-Applikation)  
Labornummer 1061, Kaninchen 2 (Gruppe I/200 mg):  
Durchfall, Exsikkose,  
Behandlung: Gentamicin und subkutane Flüssigkeitssubstitution  
Labornummer 1062, Kaninchen 15 (Gruppe II/100 mg):  
Störung des Allgemeinbefindens seit wenigen Stunden,  
Behandlung: subkutane Flüssigkeitsapplikation

Untersuchungsgang: pathologisch-anatomische Untersuchung,  
parasitologische Untersuchung (Flotation u. Sedimentation),  
mikrobiologische Grunduntersuchung (aerober Kulturversuch),  
Untersuchung auf Salmonellen (incl. Anreicherung),  
Kulturversuch anaerob (Darminhalt, incl. Anreicherung),  
mikroskopische Untersuchungen:  
Bewertung der Darmflora / Milzabklatsch (Gramfärbung),  
Herzblutausstrich (Methylenblaufärbung).  
Keimdifferenzierung (biochemisch, BD-System).

**mikrobiologische Untersuchungen**

1061 (Kaninchen 2)	<p><b>mikroskopische Untersuchung:</b> <u>Darmflora**</u> Dünndarm: einzelne plumpe grampositive Stäbchen Dickdarm: massenhaft gramnegative Bakterien, einzelne grampositive Stäbchen <u>Milzabklatsch und Herzblutausstrich:</u> Es wurden keine Bakterien nachgewiesen. <b>aerobe Kultivierung:</b> Leber, Galle, Milz und Niere: In den untersuchten Organen wurden keine vermehrungsfähigen Keime nachgewiesen. Lunge: Es wurde ein sehr geringer* Keimgehalt an schwach hämolysierenden Staphylokokken nachgewiesen. Dünndarm: Es wurden keine vermehrungsfähigen Keime nachgewiesen. Dickdarm: In der untersuchten Probe wurde ein starker* Keimgehalt an Escherichia coli nachgewiesen. <b>Untersuchung auf Salmonellen:</b> Es wurden keine vermehrungsfähigen Salmonellen nachgewiesen (Darm, Organe). <b>Untersuchung auf Anaerobier:</b> Dünndarm: Es wurde ein mittlerer* Keimgehalt an Clostridien (Cl. tertium***) nachgewiesen. Dickdarm: Es wurden keine vermehrungsfähigen Anaerobier nachgewiesen. Über die Anreicherung (gemeinsamer Ansatz für Dünndarm und Dickdarm) wurden Clostridien kultiviert. Diese wurden nicht weiter differenziert.</p>						
1062 (Kaninchen 15)	<p><b>mikroskopische Untersuchung:</b> <u>Darmflora**:</u> Dünndarm: zahlreich grampositive und gramnegative Stäbchenbakterien Dickdarm: Mischflora, darunter massenhaft gramnegative Stäbchen und zahlreich grampositive plumpe Stäbchen <u>Herzblutausstrich:</u> Es wurden keine Bakterien nachgewiesen. <b>aerobe Kultivierung:</b> Leber, Galle, Milz, Niere und Lunge: In den untersuchten Organen wurden keine vermehrungsfähigen Keime nachgewiesen. Dünndarm und Dickdarm: In den untersuchten Proben wurde ein starker* Keimgehalt an Escherichia coli nachgewiesen. <b>Untersuchung auf Salmonellen:</b> Es wurden keine vermehrungsfähigen Salmonellen nachgewiesen (Darm, Organe). <b>Untersuchung auf Anaerobier:</b> Es wurden im direkten Ansatz gesondert für Dünndarm und Dickdarm keine vermehrungsfähigen Anaerobier nachgewiesen. Über die Anreicherung (gemeinsamer Ansatz für Dünndarm und Dickdarm) wurden Clostridien kultiviert. Diese wurden nicht weiter differenziert.</p>						
<p>* semiquantitative Beurteilung anhand der Zahl koloniebildender Einheiten (kbE)</p> <table><tr><td>geringer Keimgehalt</td><td>mittlerer Keimgehalt</td><td>starker Keimgehalt</td></tr><tr><td>1-30 kbE</td><td>31-100 kbE</td><td>&gt; 100 kbE</td></tr></table>		geringer Keimgehalt	mittlerer Keimgehalt	starker Keimgehalt	1-30 kbE	31-100 kbE	> 100 kbE
geringer Keimgehalt	mittlerer Keimgehalt	starker Keimgehalt					
1-30 kbE	31-100 kbE	> 100 kbE					

- \*\* Beim Kaninchen ist der Inhalt des Dünndarmes unter physiologischen Bedingungen nahezu keimfrei; der Dickdarm enthält physiologischerweise eine ausgewogene Mischflora verschiedener, überwiegend grampositiver Keime.
- \*\*\* Cl. tertium ist ein fakultativ pathogener Darmbewohner.

### Antibiogramm

Antibiotikum	Bakterienisolat		
	Escherichia coli Labornummer 1061 (Kaninchen 2)	Escherichia coli Labornummer 1062 (Kaninchen 15)	.
Ampicillin	R	R	
Amoxycillin	I	I	
Cephalotin	R	R	
Oxytetracycline	S	S	
Tetracyclin	S	S	
Enrofloxazin	S	S	
Ciprofloxacin	S	S	
Streptomycin	S	S	
Neomycin	S	S	
Gentamicin	S	S	
Kanamycin	S	S	
Polymyxin B	S	S	<b>Bewertung</b>
Chloramphenicol	S	S	S = sensibel, empfindlich
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	S	S	R = resistent
			n.a. = nicht auswertbar

Die Antibiogramme wurden aus mikrobiologischer Sicht erstellt. Die Zulassungsbeschränkungen für einzelne Tierarten sind zu beachten.

### 4. Zusammenfassung und Bewertung

#### Labornummer 1061 (Kaninchen 2):

unphysiologischer Gehalt an Clostridien im Dünndarm,  
unphysiologischer Keimgehalt im Dickdarm (massenhaft E. coli) unter Verdrängung anderer dort physiologischerweise vorkommender Keime,  
Toxämie mit pathologisch-anatomischen Veränderungen der Milz und des Dickdarmes  
geringgradiger Befall mit Kokzidien.

#### Labornummer 1062 (Kaninchen 15):

unphysiologischer Keimgehalt (E. coli und Clostridien) im Dünndarm,  
unphysiologischer Keimgehalt im Dickdarm (massenhaft E. coli),  
Toxämie mit pathologisch-anatomische Veränderungen im Larynx und der Trachea  
geringgradiger Befall mit Kokzidien.

**Bei beiden untersuchten Kaninchen kam es infolge einer Dysbiose im Darminhalt zur Enterotoxämie mit Todesfolge durch Kreislaufversagen.**

zum Verständnis:

Die Darmflora von Kaninchen reagiert relativ empfindlich auf verschiedene Faktoren (Stress, allgemeine Erschöpfung, Applikation von Antibiotika mit überwiegend grampositivem Wirkungsspektrum, Parasitenbefall, Änderungen in der Fütterung etc.). Dann können sich potentielle Toxinbildner wie E. coli und Clostridien im Dickdarm massiv vermehren und physiologischerweise dort vorkommende andere Keime verdrängen sowie in den Dünndarm aufsteigen. Unter diesen Bedingungen werden von den genannten Bakterien größere Mengen verschiedener Toxine mit lokalen (Entzündung, Durchfall) und nach Schädigung der Darmschranke allgemeinen Wirkungen gebildet. Erfahrungsgemäß ist dieses Krankheitsbild therapeutisch häufig kaum zu beeinflussen.

Mit freundlichen Grüßen



## **SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Giessen, den 15.11.2010

Karl Hubenschmid

## **DANKSAGUNG**

Ich danke herzlichst Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhard Schnettler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH - Standort Gießen, für die Überlassung des Themas, die Benutzung der Laboreinrichtungen und die fachliche Auseinandersetzung mit der vorliegenden Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. vet. Elvira Dingeldein, Leiterin der Abteilung Forschung und Entwicklung der Fa. aap Implantate AG, für ihre fachliche und menschliche Unterstützung.

Frau PD Dr. med. vet. Sabine Wenisch, ehemalige Leiterin des Labors für experimentelle Unfallchirurgie, Universität Gießen und Marburg GmbH - Standort Gießen, danke ich für die fachkompetente Hilfestellung bei histologischen Fragestellungen und bei der Durchsicht der vorgelegten Arbeit. Sehr verbunden bin ich auch den dortigen Mitarbeiterinnen Frau Maren Cassens und Frau Anne Hild für ihre tatkräftige und freundschaftliche Hilfe bei allen Belangen der Labortätigkeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. mult. Karl Donath für die fachliche Auseinandersetzung mit den histologischen Schnitten.

Für die Hilfe bei der statischen Auswertung der Ergebnisse danke ich Herrn Dr. R.-H. Bödeker und Frau Ch. Scheibelhut von der Arbeitsgruppe medizinische Statistik der Universität Gießen und Marburg GmbH - Standort Gießen.

Prof. Dr.-Ing. R. Zeth, Geschäftsführender Direktor des Forschungszentrums für Medizintechnik und Biotechnologie e.V., Bad Langensalza, und all seinen Mitarbeitern danke ich für die Ermöglichung der operativen Versuchsdurchführung.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Vater, Heinz Hubenschmid, der mir durch tatkräftige menschliche und finanzielle Unterstützung nicht nur die Erstellung dieser Arbeit, sondern auch die Absolvierung des Medizinstudiums ermöglichte.

Tief verbunden bin ich meiner Lebensabschnittsgefährtin, Dr. Brit Jacobus, und all jenen, die mir durch ihr Interesse an der vorliegenden Arbeit und ermutigende Worte zur Seite standen.